卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-001	氏　名	青柳　早江香
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	アンブロキソール後発医薬品の製剤評価２‐味覚官能評価との関係‐		

【目的】気道潤滑性去痰作用を示すアンブロキソール塩酸塩は、多くの後発医薬品が発売され、汎用されている。しかしながらアンブロキソール塩酸塩は独特の苦味を有するため、小児が服用拒否するなどの問題が指摘されている。服薬のしやすさを特徴としたドライシロップ製剤では、製剤からの溶出性が味覚に影響を及ぼすことが考えられる。しかし、後発医薬品は、先発医薬品との生物学的同等性は保証されているものの、主薬以外の添加物については直接的な規定がない。そこで今回、アンブロキソール塩酸塩小児用ドライシロップ製剤の服用時の苦味を評価することを目的として *in vitro* 溶出試験を実施し、ヒト官能試験の結果と比較検討を行った。

【方法】被験製剤：先発医薬品 1 種を含む 4 種の 1.5%アンブロキソール塩酸塩含有小児用ドライシロップ製剤を被験製剤とした。

溶出試験：ビーカー中の 37℃の水 40 ml に各製剤 4 g を投入後、簡易撹拌機を用いて 100 rpm で撹拌した。15 秒後と 30 秒後にサンプリングし、フィルター (0.22 μm., Millex, ミリポア)濾過した。試料中のアンブロキソール量は波長 215 nm にて HPLC で測定した。

ヒト味覚官能試験：書面にてインフォームド・コンセントを得たボランティアを被験者とした。ドライシロップ製剤の懸濁液含嗽後 10 秒および 30 秒の苦味を評価した。苦味強度スコアは、アンブロキソール塩酸塩基準液を「10」、水を「0」とし、その程度を段階評価した。

【結果・考察】いずれの製剤も 15 秒後から 30 秒後にかけて溶出量が増大しており、30 秒以内では溶出が持続していた。ヒト味覚官能試験結果と比較すると、各時間の溶出量と苦味強度には相関性が認められた（溶出試験 15 秒、30 秒とヒト味覚官能試験 10 秒、30 秒がそれぞれ対応するものとした）。しかし、全ての製剤において、溶出量が高い 30 秒より 10 秒後の苦味強度の方が大きい値を示していた。この結果から、初期のアンブロキソール溶出量が味覚を支配することが示唆された。以上より、製剤の最初の溶出量を抑えることにより、苦味の軽減が期待できると考えられた。

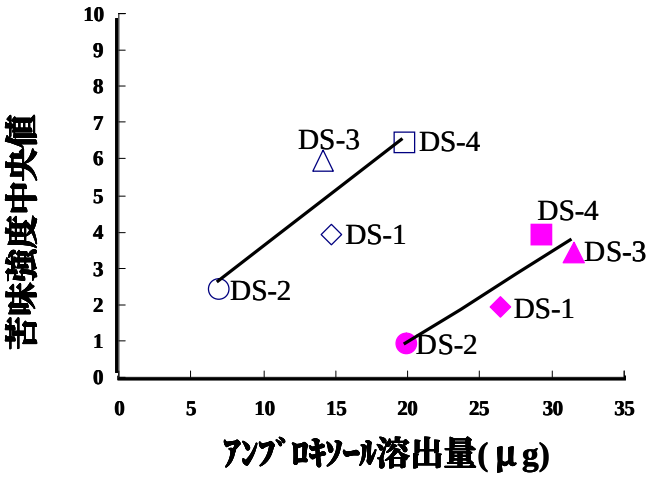


Fig.1 ｱﾝﾌﾞﾛｷｿｰﾙ溶出量と苦味強度の相関

Open symbols :味覚 10 sec‐溶出 15 sec(R^2=0.77)

Closed symbols:味覚 30 sec- 溶出 30 sec(R^2=0.83)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-005	氏　名	池田　雄太
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	ヒト個別サイトゾールを用いた抗炎症薬ナブメトンの還元的代謝に対する研究		

【目的】抗炎症薬ナブメトンは側鎖にケトン基を有し、生体内では 4-(6-methoxy-2-naphtyl)-butan-2-ol（M1）に還元的に代謝される。さらに M1 は活性代謝物である 6-methoxy-2-naphthylacetic acid（6MNA）に代謝されるため、ナブメトンから M1 への代謝について詳細な情報を把握することは重要である。種々の阻害剤を添加した代謝実験は、その還元的代謝にはカルボニルレダクターゼが関与していることが示唆していた。カルボニルレダクターゼが触媒する反応として、アセトヘキサミドからヒドロキシヘキサミド(HH)への還元的代謝が知られている。そこで本研究では、ヒト個別サイトゾールを用いて、ナブメトンから M1 への代謝活性とアセトヘキサミドから HH への代謝活性を測定した。両者の相関性を比較することで、ナブメトンの還元的代謝についてさらに詳細な検討を加えた。

【方法】8 名の異なる個体より調製されたヒトサイトゾールを用いて、アセトヘキサミドとナブメトンの還元活性を調べた。NADPH 生成系を添加したヒトサイトゾール（pH 7.4, 37℃）に 1.0 mM アセトヘキサミドまたは、50 μM ナブメトンを加えることで代謝反応を開始した。一定時間経過後(アセトヘキサミド 10 分、ナブメトン 20 分)に反応を停止し、それぞれの還元代謝物量を HPLC により測定した.

【結果】M1 および HH の生成量からそれぞれの生成速度を求めたところ、両者には有意な相関（R^2=0.92，P＜0.01）が認められた（Fig. 1）。

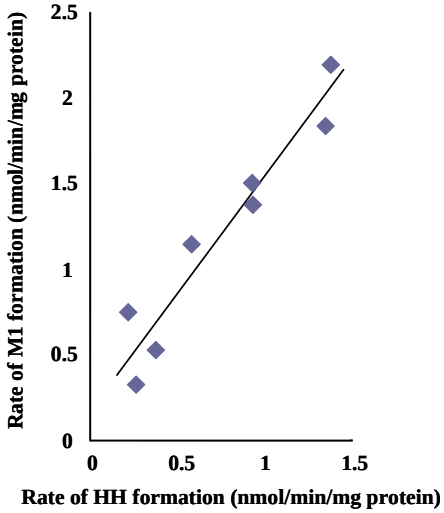


Fig. 1　Correlation between M1 formation and HH formation in individual human liver cytosol.

【考察】ヒト個別サイトゾールを用いてナブメトンから M1 への還元的代謝活性を測定したところ、アセトヘキサミドから HH への還元的代謝活性と相関がみられた。このことから、カルボニルレダクターゼは、ナブメトンの還元的代謝を触媒する酵素のひとつであることが確認された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-032	氏　名	田村　奈々
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	ビタミン B_2 含有ドリンク剤に関する製品調査と意識調査		

【目的】現在、薬局・薬店では様々なメーカーの医薬品や指定医薬部外品、健康食品が販売されている。その中から、消費者が直接手に取り選ぶ機会の多いドリンク剤についてアンケートを行い、購入する際の判断基準やメーカー認知度を調査した。これらに含有される事の多いビタミン B_2 は光に不安定であり、ルミフラビンやルミクローム等の分解物を生成するため、ドリンク剤中のビタミン B_2 の含有量と安定性を評価し、アンケート結果と併せて比較検討した。

【方法】1.　アンケート調査：書面にてインフォームド・コンセントを得た薬学生合計 50 名からアンケートを回収した。調査項目はそれぞれの製品の①メーカー認知度②購入する際の判断基準とした。メーカー認知度は「知っている人数/50 人×100」として算出した。2.　ビタミン B_2 の含有量および安定性試験：ドリンク剤開栓直後、1 日後、3 日後および 6 日後のビタミン B_2 量を HPLC で測定した。保存条件は製品容器内で、室温、4℃（冷蔵庫内）および室温・蛍光灯近距離照射下とした。

【結果】本研究で対象としたドリンク剤は、製造メーカーの異なる第 3 類医薬品（4 種）と指定医薬部外品（1 種）の 5 製品である。商品の購入は消費者と同じルートと価格で購入した。価格は 1 本当たり 126 円から 571 円の製品を用いた。アンケート結果より、メーカー認知度は 4 種が 90-96%の範囲、1 種が 58%であった。②購入の判断基準として、値段をあげた回答は 86%に昇り、その多くは安価な製品を選択する傾向がみられた。

各製品のビタミン B_2 の含有量と安定性の結果を図 1 に示す。いずれの製品も表示された量、またはそれ以上の量のビタミン B_2 が含有されていた。また、どの条件で保存した場合でも、安定性に大きな差はみられなかった。

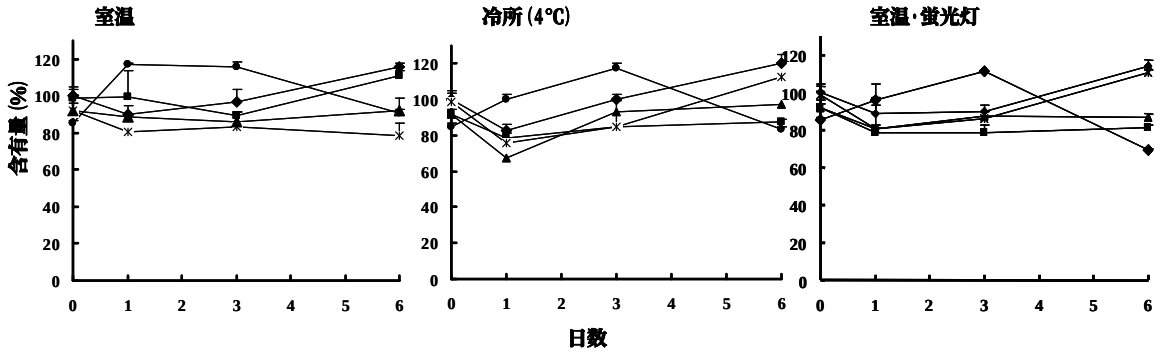


図1　各保存条件における日毎の含有量（%）■ドリンクA，◆ドリンクB，▲ドリンクC，＊ドリンクD，●ドリンクE
平均値±S.D.（n＝3）

【考察】本研究から 5 種ドリンク剤中のビタミン B_2 はいずれも表示量に対して十分な含有量を有し、通常の保存状態で安定であった。また、メーカー認知度の異なる 5 製品を比較しても大きな差はなかった。消費者は価格の安価な製品を選択する傾向があったが、安価な製品でも含有量と安定性に対する懸念は不要であると考えられた。したがって光に不安定なビタミン B_2 を含有するドリンク剤でも、購入する際に価格と表示含有量を判断基準としても問題はないと思われる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006－035	氏　名	中部　円香
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	唾液中アミラーゼ活性を指標としたラベンダー・アングスティフォリア芳香浴のストレス軽減効果の評価		

1.背景および目的

アロマセラピーは、手軽に心身の疲れを癒す方法として、近年注目を集めている。アロマセラピーの効果の評価は、心拍数・血圧の測定やアンケート調査などを用いて数多く報告されているが、効果を直接的かつ定量的に評価した報告は少ない。そこで本研究では、アロマセラピーのストレス軽減効果の評価に、非侵襲的に迅速測定できる唾液中のアミラーゼ活性を用いた。アロマセラピーには多数のエッセンシャルオイルの中から、最もポピュラーな香りのひとつであるラベンダー・アングスティフォリアを選択した。

2.方法

1)対象：健常な薬学部学生（5 年生）50 名を被験者とした。被験者には予め実験内容を説明し、書面にて同意を得た。

2)アンケート調査：年齢、性別、自覚体調（良好・概ね良好・やや不調・不調の 4 段階）、ラベンダー・アングスティフォリアの香りの好き嫌いをアロマセラピー施術前に書面にて実施した。

3)アロマセラピーの施術：エッセンシャルオイルを精製水で 1.3 %に希釈したものを超音波アロマディフューザーで空気中に拡散させ、5 分間のアロマセラピー（芳香浴）を施した。施術は静謐な室内で、自律神経の日動変動が少ないとされている午前中に行った。

4)アミラーゼ活性の測定：施術直前、施術後 3 分および 5 分のアミラーゼ活性を唾液アミラーゼモニター（CM-2.1 ニプロ(株)）で測定した。唾液は各時間に専用チップを舌下に 30 秒含むことでサンプリングした。

3.結果および考察

施術後 3 分後および 5 分後のアミラーゼ活性は施術前の値と比較して低下する傾向が見られた。施術前と施術後 3 分後のアミラーゼ活性値の間には、有意な差が見られた。施術前のアミラーゼ活性値は被験者によって、2 KIU/L から 84 KIU/L と大きく異なっていた。平常時のアミラーゼ活性値は、日常的に感じるストレスを反映するといわれているため、施術前のアミラーゼ活性値の違いから被験者を 3 群に層別し、比較検討を行った。

表 1　唾液中アミラーゼ活性値と変化の割合

施術前の唾液中アミラーゼ活性値（被験者数）	唾液中アミラーゼ活性値の変化 (%)		
	施術前	3 min	5 min
70 KIU/L 以上(n=2)	78.50 KIU/L	51.50 KIU/L(-34.39%)	48.00 KIU/L(-35.85%)
70 KIU/L未満30 KIU/L以上(n=15)	44.40 KIU/L	29.87 KIU/L(-22.22%)	35.93 KIU/L(-19.08%)
30 KIU/L未満(n=33)	16.91 KIU/L	17.76 KIU/L(5.03%)	18.18 KIU/L(7.51%)

唾液中のアミラーゼ活性の変化の割合を比べると、施術前のアミラーゼ活性値の高い群ほど唾液中のアミラーゼ活性の低下率（%）が大きい傾向がみられた。一方、男女別、香りの好き嫌いおよび自覚体調別に比較検討したところ、各群の間のアミラーゼ活性変動に違いを見いだすことはできなかった。

以上の結果から、ラベンダー・アングスティフォリアのアロマセラピー（芳香浴）によるストレス軽減効果は、平時のストレスの高い状態で、強くあらわれる事が示唆された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-068	氏　名	毛塚　綾乃
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	唾液中アミラーゼ活性を指標としたオレンジ・スイート芳香浴のストレス軽減効果の評価		

1.背景および目的

アロマセラピーは香りを利用して心身を心地よい状態へ導く方法として、私たちの生活の中に広く浸透してきている。また近年は治療の補助療法という位置付けで、医療現場で使用されるケースも増えている。一方、アロマセラピーの効果の評価は、被験者の主観に委ねたものが多く、定量的に評価した報告は少ない。そこで本検討では、エッセンシャルオイルの中からオレンジ・スイートを選択し、唾液中のアミラーゼ活性値を指標としてアロマセラピーのストレス軽減効果の評価を試みた。

2.方法

1)対象: 健常な薬学部学生（5 年生）50 名を被験者とした。被験者には予め実験内容を説明し、書面にて同意を得た。

2)アンケート調査: アロマセラピー施術前に年齢、性別、自覚体調（良好・概ね良好・やや不調・不調の４段階）およびオレンジ・スイートの香りの好き嫌いについて書面にてアンケートを実施した。

3)アロマセラピーの施術: エッセンシャルオイルを精製水で 1.3%に希釈したものを用い、超音波アロマディフューザーで空気中に拡散して 5 分間のアロマセラピー（芳香浴）を施した。施術は静謐な室内で、自律神経系の日内変動が少ないとされている午前中に行った。

4) アミラーゼ活性の測定: 施術直前、施術後 1 分および 3 分に唾液をサンプリングし、アミラーゼ活性を唾液アミラーゼモニター(CM-2.1、ニプロ㈱)で測定した。唾液のサンプリングは専用のチップを舌下に 30 秒含むことで行った。

3.結果および考察

被験者全体のアミラーゼ活性値は、アロマセラピー施術前と施術後 1 分および 3 分のアミラーゼ活性値の間に有意な低下がみられ、アロマセラピーによるストレス軽減効果が示唆された。

施術前の唾液中アミラーゼ活性は被験者によって大きく異なり広範囲の値を示したが、これは被験者が日常の生活で感じているプレ・ストレスの程度の違いと考えることができる。そこで、施術前のアミラーゼ活性値から被験者を 3 群に分け層別比較した。70 kIU/L 以上および 70 kIU/L 未満 30 kIU/L 以上の群ではアロマセラピー後のアミラーゼ活性に有意な低下がみられたが、30 kIU/L 未満の群では有意な差がみられなかった。また、唾液中アミラーゼ活性の変化を調べると施術前の唾液中アミラーゼ活性が高い群ほど低下の度合が大きかった。以上の結果から、オレンジ・スイートの芳香浴によるストレス軽減効果は、プレ・ストレスが高い状態で、特に強くあらわれることが示唆された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-079	氏　名	只木　信貴
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	ビタミン B_2 含有製品に関する製品評価と意識調査		

【背景】現在、様々なメーカーから医薬品や健康食品が販売されている。消費者の立場からみると、認知度の低いメーカーのこれら製品の品質に対する不安が少なからず存在する。ビタミン B_2 は、医薬品、食品として多くの製品が薬局やドラッグストア、コンビニエンスストアの店頭、さらにはインターネット通販を通して販売されており、消費者自らが直接手に取り、選ぶ機会の多いビタミンのひとつである。また、ビタミン B_2 は分解しやすい化合物として知られている。そこで B_2 含有製剤を選択する上で有用となる情報を明らかにすることを目的に、製品中の B_2 量を測定し、消費者にアンケート調査を行った。

【方法】平成 23 年 3 月に城西国際大学の薬学部学生を対象に、市販 B_2 製品に関するアンケート調査を行った。インフォームドコンセントを得た合計 50 人からアンケートを回収できた。調査項目は、①販売メーカーを認知しているか、②購入判断基準（業者名・商品名・値段・デザイン・剤形・広告・効き目・人に勧められて・その他）とした。メーカー認知度は、「知っている人数／50 人×100」として算出した。対象とした製品は医薬品の錠剤(8 製品)、顆粒剤（2 製品)、食品の錠剤(5 製品)、ドリンク(5 製品)の合計 20 種類である。これらはすべて消費者と同じ流通ルートおよび価格で購入した。B_2 製品の表示成分は、リボフラビン、リボフラビンリン酸エステル、リボフラビン酪酸エステルの 3 種類ある。これらの含有量を高速液体クロマトグラフ法により測定し、表示量と比較した。

【結果】アンケート回答者は男 28 名、女 22 名であり、これら消費者の購入判断は 43 人(86%)が値段を選び、そのうち 36 人が安価な製品を選択する傾向がみられた。また、対象とした製品について、ビタミン B_2 量を測定したところ、全ての製品において多少のばらつきはあるものの表示量の 90%以上の含有率が確認できた。

【考察】ビタミン B_2 含量とメーカー認知度との関係を見ると、B_2 製品では消費者が抱く含量の問題に対して、製品の分類(医薬品、食品)や剤形およびメーカー認知度はほとんど関係しないものと考えられた。また、各製剤を表示通りに服用したときの 1 日あたりの費用と服用量の関係について検討したところ、ドリンクおよび顆粒剤は他の剤形と比較して高価であった。また、価格が安く表示量の低い製品はビタミン B_2 の含有はあくまで補助的なものであり、他の成分(エゾウコギ乾燥エキス、オウギ乾燥エキス等)を重視している製品であった。消費者が抱くビタミン B_2 含量の問題に対して、価格はほとんど影響なく、どの製品も規格に合うビタミン B_2 が含まれていた。また、価格を重視する消費者は錠剤がニーズに合うものと推察された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-086	氏　名	野口　正和
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	ヒト個別ミクロソームを用いた抗炎症薬 nabumetone の還元的代謝に関する研究		

【目的】

持続性抗炎症･鎮痛薬である nabumetone は、生体内に複数の代謝反応経路をもつ。Nabumetone から還元代謝物 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-ol(M1)への代謝に関して、我々は種々の検討を行なってきた。M1 は続いて活性代謝物である 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid(6MNA)に代謝されるため、nabumetone から M1 の代謝について情報を得ることは有益である。既に我々は、11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-HSD)阻害剤である 18β-glycyrrhetinic acid が、nabumetone から M1 への生成を抑制することを報告している。そこで本研究では、7 名の異なる個体より調製されたヒト個別肝ミクロソームを用いて、nabumetone から M1 への代謝活性と、11β-HSD が触媒することが知られている cortisone から cortisol への代謝活性を測定した。両者を比較し nabumetone から M1 への還元代謝に対する 11β-HSD の関係について検討した。

【方法】

NADPH 生成系を含むヒト個別ミクロソーム(pH7.4、37℃)に 1 mM cortisone または 5 mM nabumetone を加え代謝反応を開始した。一定時間経過後(cortisone：60 分、nabumetone：20 分)、反応を停止した。その後、反応液に内部標準物質を加え、さらにフィルターろ過したものをサンプルとし、HPLC で代謝生成物量を定量した。

【結果・考察】

ヒト個別ミクロソームを用いて cortisone から cortisol への反応速度と nabumetone から M1 への反応速度を比較したところ、両者の間には有意な相関が認められた(Fig.1)。以上により nabumetone から M1 への還元的代謝反応には 11β-HSD が関与していることが示唆された。

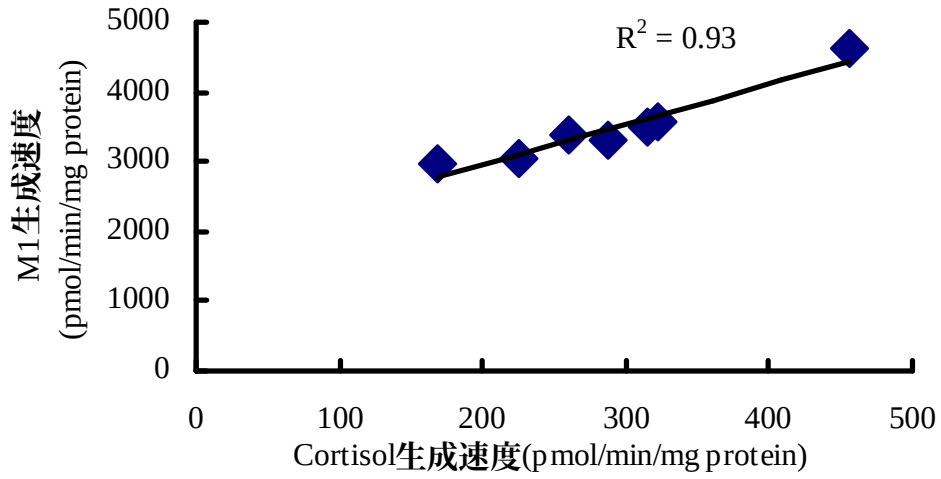


Fig.1:Cortisol と M1 の生成速度の相関

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-169	氏　名	鈴木　達彦
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	アンブロキソール後発医薬品の製剤評価 1 - 味覚官能評価との関係 -		

【目的】

現在、医療費削減の一環として後発医薬品の普及が推進されているが、日本での普及率は二割程度に留まっている。後発医薬品の承認には、先発医薬品との生物学的同等性の確保が必須であるが、主薬以外の添加物については直接的な規定はない。しかし、服薬のしやすさを特徴とした製剤では、薬効以外にもコンプライアンスの面から味や匂いなどの違いを軽視できない。そこで本研究では、苦味を有する去痰薬アンブロキソールのドライシロップ製剤の後発医薬品の味覚に着目した。先発医薬品と後発医薬品、計 4 種類の製剤の粒子径を測定し、これらの味覚官能試験結果との相関について検討した。

【方法】

被験製剤：先発医薬品 1 種を含む 4 種の 1.5%アンブロキソール含有ドライシロップ製剤について試験した。

粒子径測定：顕微鏡法で粒子径を測定した。4 種類のドライシロップ製剤の Green 径と Heywood 径をオリンパス生物顕微鏡 CX31 で測定した。測定数はそれぞれ 500 個とした。

味覚官能試験：書面にてインフォームド・コンセントを得たボランティア 10 名を被験者とした。ドライシロップ製剤の懸濁液を口に含んだ後の苦味、甘味、および後味を評価した。苦味強度スコアは、水を「0」、アンブロキソール塩酸塩基準液を「10」、甘味強度スコアは水を「0」、ショ糖溶液を「10」とし、それぞれの程度を段階評価した。また、吐き出した後の総合的な味覚満足度および口腔内の物理的感触などの評価を後味として段階評価した。

【結果・考察】4 種のドライシロップ製剤の粒子径の中央値は、Green 径が 235.4、341.7、466.0 および 831.3 μm、Heywood 径が 184.7、251.8、430.0 および 738.4 μm であった。どちらも粒子径のランクオーダーは同じで、また、後発医薬品の方が粒子径は小さかった。粒子径と味覚官能試験との関係は、粒子径が大きい製剤ほど苦味は低いスコアを示し、逆に甘味と後味は高いスコアを示す傾向がみられた。溶出速度には粒子径の大きさも影響を及ぼすと考えられることから、アンブロキソールの溶出量が苦味強度に影響していると推察した。別に実施した溶出試験と味覚試験の結果からも同様の結果が示唆されている。一方、4 種のドライシロップ製剤には、アスパルテーム、白糖やマンニトール等が数種添加されている。粒子径が大きい製剤で苦味を感じにくいという結果は、アンブロキソールの溶出量だけでなく、これら添加物の選択や添加量といった製剤的な工夫が関与していると思われた。また、被験製剤の示した粒子径範囲では、粒子径が大きい製剤の方が後味は良好であるという傾向が認められた。後発医薬品は先発品と薬効は同じであることが保障されているが、味覚や使用感などにはそれぞれ違いがあることが判明した。アンブロキソールのドライシロップ製剤は小児における使用が高い事を考えれば、苦味が低く、甘味が高い製剤は後味も良好である事から、コンプライアンスの向上につながると思われる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-187	氏　名	山﨑　貴之
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	凍結肝細胞を用いた抗炎症薬 nabumetone の代謝に関する研究		

【緒言】非ステロイド性抗炎症薬である nabumetone (NAB) は、カルボン酸の構造を有しないプロドラック製剤であり、体内で代謝され、抗炎症・鎮痛作用を示す 6-methoxy-2-naphthyl acetic acid (6-MNA) に変換される。NAB の代謝経路は、O-脱メチル化、ケトン基の還元および butanone 側鎖の酢酸への酸化が知られており、ヒトを含む種々の動物でこれらの経路が観察されている。6-MNA の生成経路は、NAB の直接代謝の他に、還元代謝物である 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-ol (M1)を経てから 6-MNA に変換される経路が存在しており、ラットに M1 を経口または静脈内投与した時に、NAB と同様に 6-MNA の生成が報告されている。本研究室では M1 から 6-MNA への代謝経路を明らかにするために、ラット、ヒト肝ミクロソームを用いて探索を試みた。しかし、ラット、ヒト肝ミクロソームでは、M1 から 6-MNA の生成を確認できなかった。そこで、肝ミクロソームより実際の生体肝組織に近いと考えられるラット、ヒト凍結肝細胞を用いて、M1 から 6-MNA への代謝経路について検討した。

【方法】液体窒素のタンクから凍結肝細胞を取り出し、37℃の水浴にて速やかに解凍し、Krebs-Henseleit Buffer を用いて 1.0×10^6 cell/mL に懸濁した。24 ウェルプレート上で M1 溶液 (200 μM) と肝細胞の懸濁液を 1:1 の割合で混合し、5%CO_2 incubator で、60 min、37℃の条件で incubate した。incubate した後、内部標準物質 naproxen を溶解した acetonitrile を添加し、代謝反応を停止させた。反応停止後の溶液を 10,000×*g*、5 min の条件で遠心分離を行い、その上清 500 μl を固相抽出カートリッジに通し、Hexane:Ethyl acetate=1:1 で溶出した。その溶出液を遠心エバポレーターで揮発させ、残液を 5 ml の移動相に溶解し、0.45 μm メンブランフィルターに通したものを試料とした。代謝物 6-MNA の定量は、蛍光 HPLC 法により行った。カラムは C18 逆相カラム (YMC-Pack ODS-A(5 mm,12 nm)150×4.6 mm)、移動相は 20 mM K_2HPO_4 (pH3.0):CH_3CN=3:2 を用いた。カラム温度は 30℃、流速 1.0 ml/min、波長は励起波長 280 nm、蛍光波長 350 nm で測定した。

【結果及び考察】ラット、ヒト凍結肝細胞を用いた代謝実験により、M1 から代謝物 6-MNA の生成が確認できた。一方、ラット・ヒト肝ミクロソームを用いた実験では、6-MNA の生成は確認できなかった。この理由として、肝ミクロソーム以外の薬物代謝酵素が関与していることが考えられた。したがって M1 から 6-MNA の代謝経路を検討するためには、遊離肝細胞や凍結肝細胞を用いて代謝実験を行う必要があると考えられた。凍結肝細胞を用いた代謝実験の結果、6-MNA の生成速度 (nmol/min/million cells)を求めたところ、ヒトで 0.10 ± 0.052 nmol/min/million cells (mean ± SD、n=3)、ラットで 1.39 ± 0.338 nmol/min/million cells (mean±SD、n=3)と 6-MNA の生成速度に違いがみられた。これは、M1 から 6-MNA の代謝速度に種差が存在するものと考えられた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-210	氏　名	駒木根　典之
所属研究室	薬物動態学研究室		
研究テーマ	ラット肝ミクロソームを用いた nabumetone の活性代謝物 6-MNA の代謝に関する研究―CYP 分子種の検討―		

【背景】プロドラッグである nabumetone は、抗炎症・鎮痛薬として臨床で用いられている。nabumetone は酸化的に代謝され活性体の 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA)になり、その後、肝臓で 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (6-HNA)に変換され、主に抱合体として尿中に排泄される。本研究室では、6-MNA から 6-HNA への代謝について CYP 分子種発現系ミクロソームおよび抗体を用いて検討してきた。その結果、ラットにおける 6-MNA から 6-HNA の代謝には、CYP2C11 と CYP2C6 が関与していることが示唆された。そこで本研究では、雄性および雌性ラットのミクロソームに阻害剤 cimetidine または CYP2C11 抗体を添加した代謝実験を行い、さらに詳細な検討を試みた。

【方法】NADPH 生成系を含むラット肝ミクロソーム(雄性および雌性)に cimetidine 50 μM または CYP2C11 抗体 40 μL を加えたところに、6-MNA 200 μM を添加し、37℃で一定時間 incubate した(阻害剤添加系では 40 分、抗体添加系では 60 分)。生成した 6-HNA 量は、蛍光 HPLC 法(内部標準物質：naproxen)で測定した。

【結果・考察】6-HNA のコントロール群に対する生成率は cimetidine (50 μM)の添加により雄性ラットミクロソームで約 50%、雌性で約 70%に低下した。また、CYP2C11 抗体の添加では、雄性および雌性ラット共にコントロール値の約 20%に低下した。なお、コントロールの 6-HNA 生成量はいずれも雄性の方が雌性よりも約 1.5 倍大きかった。CYP2C11 抗体は、CYP2C11 だけでなく CYP2C6 ともクロスリアクトすることが報告されている。また、雌性ラットにおいて CYP2C11 は雌性ラットミクロソームにはほとんど発現していないことが知られている。cimetidine による 6-HNA 生成の抑制に雄性および雌性の違いが見られたのは cimetidine の CYP2C11 と CYP2C6 に対する阻害効果の差に起因するものと思われる。また、CYP2C11 抗体の添加により 6-HNA の生成量が低下しているのは、CYP2C11 抗体が CYP2C6 と反応し、その結果 6-MNA から 6-HNA の代謝が抑制されたものと推察した。以上の結果から、雄性および雌性ラットにおける 6-HNA 生成には、CYP2C11 と CYP2C6 が関与していることが強く示唆された。

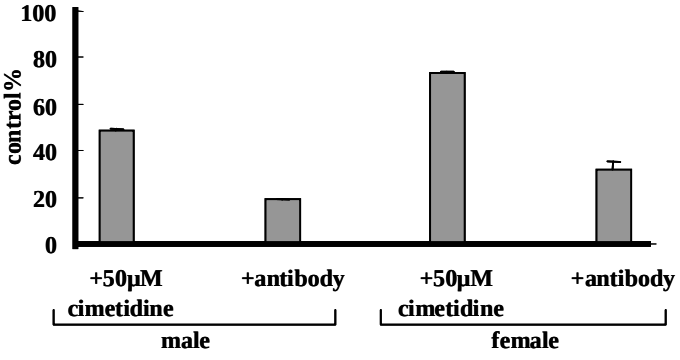


Fig.1 Inhibitory effects of cimetidine and antibody against CYP2C11 on 6-HNA formation in rat hepatic microsome.

Each point represents the mean ± S.D. (n = 3).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-008	氏　名	上野代　香里
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	肺がんと子宮頸がんの潜伏期の検討		

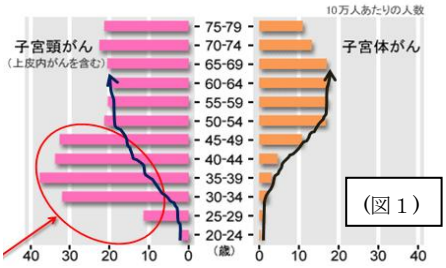
【目的】がんは多段階発がん機構により発生するため、潜伏期は１０～５０年と漠然と考えられている。現在男性のがん死亡数第一位は肺がん、婦人科領域がん発症率第一位は子宮頸がんであり、これら二つのがんは主要な原因が明確となっているので、この二つのがんについて潜伏期をより限定出来るかを検討した。

【方法】厚生労働省、国立がん研究センター、JT で公開されているデータをもとにして、がんの原因と発生率・死亡率の推移から潜伏期を検討した。

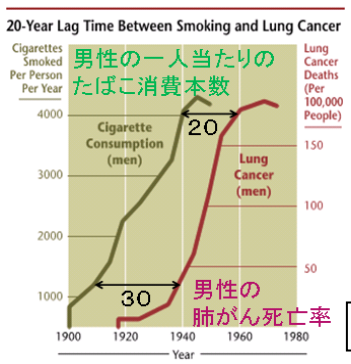
【結果・考察】子宮頸がんは性交渉により感染するヒトパピローマウイルス(HPV)が主要な原因であり、一般的に１０代後半から２０代前半に初感染が多いと推測出来る。子宮頸がんの発症率は３０～４０代に増加している事から(図１)、ウイルスに起因するがんの潜伏期は１０～１５年と見積もる事が出来る。一方６０～７０代でのがんの発生は、５０代、６０代に HPV の感染を経ている事になるため、ウイルス起因とは考えにくく加齢由来のがんと考えられる。実際ウイルスが原因でない子宮体がんも５０～６０代に最も多い(図１)。これらの事から、子宮頸がんはウイルスに起因するがんと加齢由来のがんの両方があると考えられる。

肺がんは、アメリカでは男性の一人当たりのたばこ消費量と肺がん死亡率に相関があるため潜伏期は２０～３０年と推測出来る(図２)。日本でも同様に一人当たりのたばこ消費量と肺がん死亡率を比較したところ、アメリカのような相関性が認められなかった（図３)。

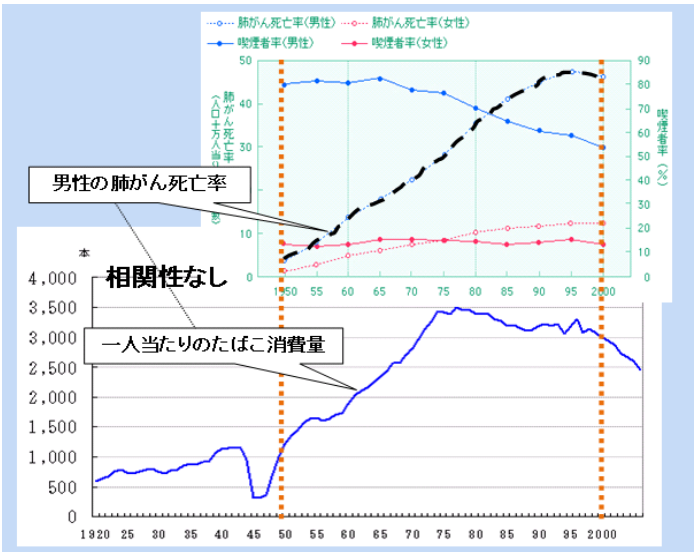
以上をまとめると、子宮頸がんの潜伏期は１０～１５年程度で、一方肺がんは、アメリカとは違って喫煙とは明確な相関性が見られず、潜伏期を限定する事が出来なかった。



（図１）



（図２）



（図３）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-031	氏　名	田中　洋平
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	妊娠初期に服用する風邪薬の害について		

【目的】妊娠初期（2~2 ヶ月半）のサリドマイド服用や風疹感染は胎児に障害を引き起こすことが知られている。しかし、風邪薬など処方せんなしで購入できる薬物については「危険性が有益性を上回ると判断された場合のみ投与可能」とされているものが多い。現実には、このような有益性の判定が行われないまま内服されているのが実状である。そこで、妊娠初期に風邪薬を服用しても本当に害はないのか、もし害があるならどの程度なのかを検討する。

【方法】①1 年のうちでもっとも風邪薬が服用される時期を 12~2 月と仮定した。この時期が妊娠初期だとすると出生は 9~11 月、流産は 1~5 月となる。死産とは、胎児のまま死亡するケースと分娩直前あるいは分娩中に死亡するケースを合わせたものであり、前者の方が 10 倍以上多いので、胎児のまま死亡するケースを死産数として比較検討した。死産は 4~8 月とそれ以外の月の死産数、障害児は 9~11 月に出生した障害児数とそれ以外の月に出生した障害児数、流産は 1~5 月の流産数とそれ以外の月の流産数について比較した。②インフルエンザが流行した年（2005 年）と流行していない年（2001 年）について（図 1）、4~8 月の死産数、9~11 月の障害児数、1~5 月の流産数を比較した。

【結果】①：出生した障害児数、流産数については月別データが得られなかったため、比較することができなかった。しかし、死産数については月別データを検討してみたが、有意な差は見られなかった。（図 2）

②：障害児数、流産数について月別データは得られなかった。しかし、年間データは得られたのでそれを比較すると有意な差は見られなかった。また、死産数については月別データを検討してみたが、有意な差は見られなかった。（図 3）

図 1

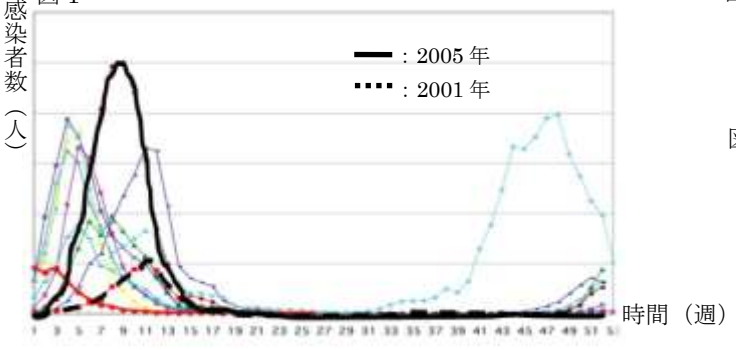


図 2 ・死産数について(2006 年)

月	出産数(人)	死産数(人)	死産率(%)（死産数/出産数）
4~8月	471, 700	12, 705	2. 7
その他の月	651, 885	18, 206	2. 8
合計(1年)	1, 123, 585	30, 911	2. 8

図 3 ・死産数について

	出産数(人)	死産数(人)	死産率(%)（死産数/出産数）
2005年 4~8月	457, 157	13, 139	2. 9
2001年 4~8月	607, 665	15, 603	3. 0

・流産数について

	妊娠12~23週の死産数			
	12~15週	16~19週	20~23週	計(人)
2005年	3, 886	3, 852	2, 487	10, 225
2001年	4, 138	4, 514	2, 956	11, 608

【考察】妊娠初期に風邪薬を服用しても危険視することはないと考えられる。風邪薬はアメリカやオーストラリアにおける分類（胎児危険度分類）において安全とされているが、現在日本での基準は確立されていない。死産数では差が見られなかったが、障害児数と流産数の月別データが分かれば本当に安全なのかが見えてくる可能性がある。妊婦に対する風邪薬の害の軽度、頻度をより詳しく知るために、さらに詳しい障害児出生数と流産数の統計を取るべきである。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006－038	氏　名	濱田　真梨子
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	ムンプスワクチン定期接種における有益性の検討		

【目的】現在日本において麻疹や風疹の予防ワクチンは定期接種であるが、ムンプスワクチンは任意接種である。アメリカでは 1967 年にムンプスワクチンの任意接種が始まり、患者数が激減した（図 1)。続いて 1977 年に定期接種化され、さらに 1989 年に二回定期接種が導入されたことにより患者数が 0 に近づいたことがわかる（図 1)。一方、日本では 1981 年に任意接種が始まったのにも関わらず周期的に流行を繰り返している（図 2)。そこで日本でも定期接種を実施した方が良いかどうかを検討する。

【方法】①ムンプスワクチンの副作用発生率と定期接種のワクチンの副作用発生率を比較した。②ムンプスワクチンの副作用のうち発生率の高い無菌性髄膜炎に注目して、同じ副作用が起こる薬物と発生率を比較した。

【結果】①図 3、4 からムンプスワクチンの予後不良副作用発生率と定期接種のワクチンの副作用発生率を比較したところ、麻疹・風疹混合ワクチン（MR）とポリオにおいてはムンプスワクチンより副作用発生率が低く、BCG についてはムンプスワクチン接種による副作用発生率の 2 倍であった。②製薬会社からの回答と添付文書の記載において薬物による無菌性髄膜炎の発生率は最も低いもので 0.16%であり、ムンプスワクチン接種による無菌性髄膜炎発生率の方が 0.01%と低かった。

【考察】ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎発生率は薬物による無菌性髄膜炎発生率よりも低く、この結果だけをみるとムンプスワクチン定期接種推奨を実施した方が良いという判断材料になる。しかし、ワクチンは健康な人に予防目的で接種するのに対して、薬物は病気の人に治療目的で用いるため比較対象が異なること、さらに薬物効果を調査した母集団がワクチンのそれと比較して小さいことから定期接種を推奨する根拠としては不十分と考えられる。しかしムンプスウイルスの自然感染による合併症発生率よりもムンプスワクチンによる副作用発生率が低いこと、すでに定期接種の承認がされているＢＣＧよりムンプスワクチンの副作用発生率が低いことを考慮すると、ムンプスワクチン接種を定期接種化に組み込まれても良いのではないかと考えられる。

図 1

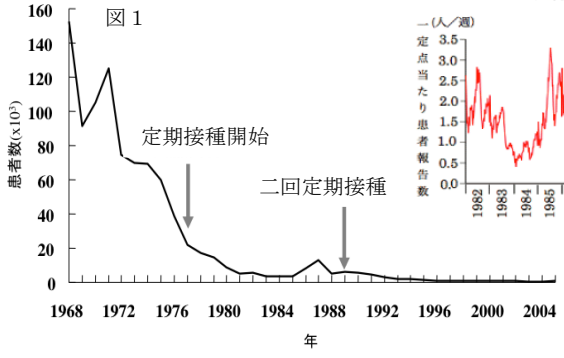


図 2　流行性耳下腺炎の定点当たり報告数の推移（1982～2010年第39週）

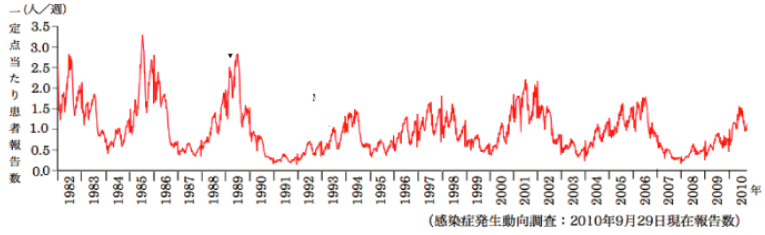


図 3　ムンプスワクチン副作用発生率

不可逆性難聴 (予後不良)	無菌性髄膜炎 (予後良好)
０.００２%	０.０１%

図 4

	接種者数	副作用発生率
麻疹	11,300 人	2 人（0.02%）
風疹	61,209 人	0
MR	1,937,568 人	5 人（0.0003%）
ポリオ	2,054,380 人	3 人（0.0001%）
BCG	978,075 人	40 人（0.004%）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-109	氏　名	奥田　和貴
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	尿中のミトコンドリア膜電位低下抑制物質の半精製		

【目的】　ROS 誘導物質を低血清条件で細胞に処置するとミトコンドリア膜電位低下を誘導する。その後血清を添加すると膜電位が回復することがわかっている。

そこで高分子タンパク質を除くと血清とほぼ同一成分である尿を用いて、ミトコンドリア膜電位低下抑制物質を分離精製する。

【方法】　早朝尿を 3 日間で 1.5 l 集め、硫安沈殿による分画を行い、透析濃縮した。その後 SDS-PAGE を行い、CBB 染色をした。得られた分画を細胞に前処置し、ROS 誘導物質を添加した。ミトコンドリア膜電位の変化を蛍光色素である TMRM を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果】　fraction1（硫安濃度 0-30%）と fraction2（硫安濃度 30-80%）についてタンパク定量を行い濃縮倍率を求めた（図 1)。SDS-PAGE において異なる泳動パターンが得られた（図 2)。ミトコンドリア膜電位の変化を観察したところ、fraction2 においてミトコンドリア膜電位低下の抑制が認められた（図 3、スケールバー: 10 μm)。

図 1

	タンパク濃度	回収量	タンパク量	濃縮倍率
starting	40 μg/ml	250 ml	10 mg	−
fraction1	460 μg/ml	4 ml	1.84 mg	× 12
fraction2	435 μg/ml	4 ml	1.74 mg	× 11

図 2

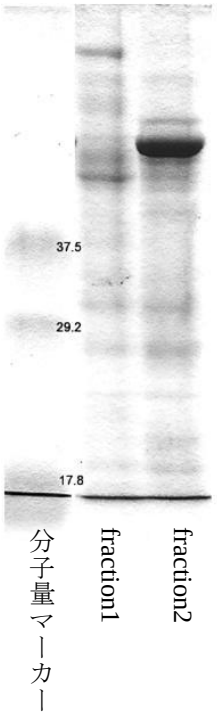
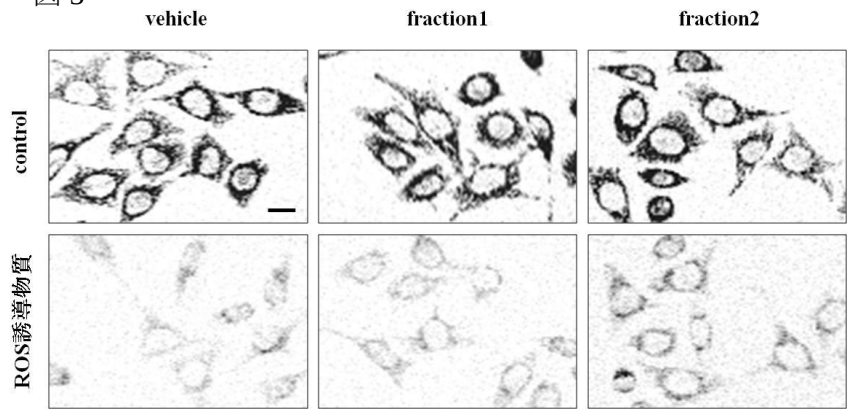


図 3



【考察】　尿を半精製することによりミトコンドリア膜電位低下抑制物質が得られた。control との TMRM シグナル強度の比較から fraction2 のみでは ROS 誘導物質によるミトコンドリアの膜電位低下を完全に抑制するには至らなかった。このことは、fraction2 以外の膜電位低下抑制物質の存在を示唆するものである。今後 fraction2 をさらに精製し抑制物質を同定するとともに、fraction2 以外の膜電位低下抑制物質との関わりを調べる必要がある。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-122	氏　名	須藤　高古
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	HDL-cholesterol が基準値よりも低いと短命か		

【目的】一般的に、LDL-cholesterol（LDL）は基準値(LDL>140 mg/dl)よりも高値であると動脈硬化性疾患に罹患するリスクが高まるため基準値以下の方が良いとされている。一方、HDL-cholesterol（HDL）は基準値(HDL>40 mg/dl)よりも高値の場合は長生きと言われているが、基準値よりも低値の場合は寿命にどの様な影響を与えるかは未だ明確にされていない。そこで、低 HDL 値と寿命の関連性について明らかにすることを目的とし検討した。

【方法】HDL 値が基準値よりも高めの方が長生きかどうか、コクランアーミテージ傾向性検定を用いて検討した(Fig.1-2)。参考文献を精読し、低 HDL 値と寿命の関連性について検討した。

【結果】日本人について、総死亡率のハザード比（HR）と HDL 値を比較すると、HDL 値が 70 mg/dl 以上のとき有意差が認められたが、他の HDL 群においては有意差が認められなかった(Fig.1)。死亡した割合と HDL 値についてコクランアーミテージ傾向性検定を行ったところ、HDL 値が高値になるにつれて死亡する割合が減少する傾向が見られた(Fig.2)。

白人について低 LDL 値(70 mg/dl 以下)と HDL 値について比較したところ、HDL 値が低くなるにつれて心血管系疾患リスクが上昇する傾向がみられた(Fig.3)。心血管系疾患のリスクが高い集団の背景には、BMI・トリグリセリド（TG）・糖尿病・喫煙などのリスクファクターがより密接に関連していることが分かった(Fig.4)。日本人についても、HDL 値が低い集団ほど BMI・TG・糖尿病・喫煙などのリスクファクターがより密接に関連していた（参考文献１）。

【考察】以上から、低 HDL 値とその他のリスクファクターに関連性がみられるが、低 HDL 値と総死亡率には関連性があると考えられる。

Fig.1（参考文献１より）

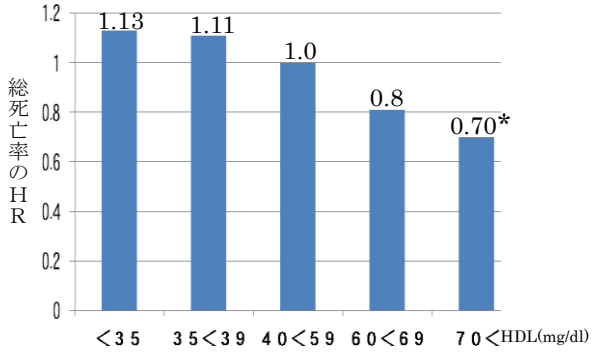


Fig.2（参考文献１より）

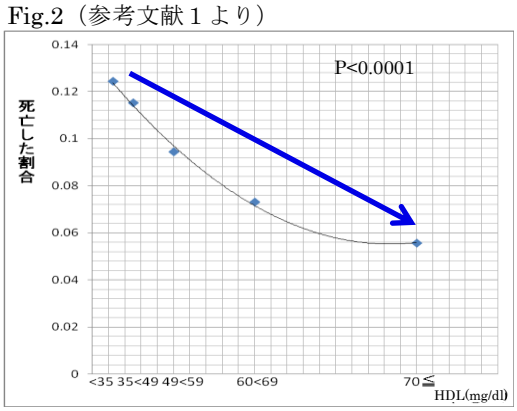


Fig.3（参考文献２より）

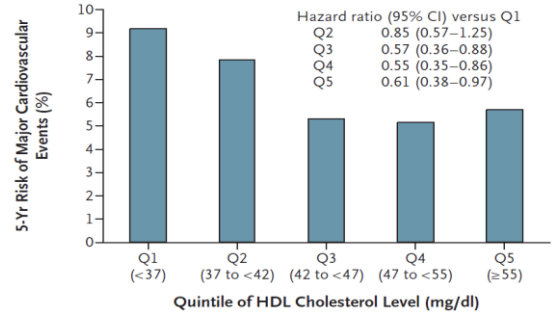


Fig.4（参考文献２より）

HDL(mg/dl)	<38	38<43	43<48	48<55	≧55
BMI	29.9	29.1	28.6	28.0	27.2
喫煙率	20.6%	15.7%	11.9%	10.1%	9.8%
TG	185.6	166.1	146.7	138.7	122.0
心筋梗塞	63.0%	60.7%	58.2%	56.5%	54.2%
糖尿病	21.2%	17.1%	14.6%	12.8%	10.6%

【参考文献】1)Okamura,T.et al., Atherosclerosis 2006;184: 143-150.

2)Barter P.et al., N Engl J Med. 2007; 357: 1301-10.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-132	氏　名	錦　佑輔
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	大腸がん検診（便潜血検査）と死亡率減少の関係性の実態		

【目的】現在日本において大腸がん検診の主流は便潜血検査免疫法で、40 歳以上を対象にして行われている。便潜血検査免疫法の有効性については直接的証拠が厚労省のガイドラインで示されている。図 1 はガイドラインを抜粋したもので日本人を対象にした症例対照研究において、1995 年の研究結果では 60%の死亡率減少効果があり、さらに 2000 年の研究結果では 81%の死亡率減少効果があることがわかる。それにも関わらず、全体的な大腸がんの死亡率の年次推移に減少はみとめられない（図 2)。大腸がん検診の有効性が証明されているにも関わらず、死亡率の低下に反映されていないのは何故かを検証する。

【方法】大腸がんによる死亡率の推移と検診の研究結果・検診成績から比較検討した。

【結果・考察】がん検診の目的は早期発見・早期治療であり、大腸がんは Stage0~1 で発見できれば 5 年生存率が 90%を超えている。検診受診率の推移は 2008、2009 年で 16%と低く、最近 10 年間で 3%程度変動していた（図 2)。便潜血検査受診者の中で要精検率は 7%でそのうち精密検査受診率は 55%であった。検診対象者から考えると精密検査を受けた人の割合は 0.5%でありそのうちがんと診断される割合はさらに低くなるので全体の死亡率低下に繋がりにくいと考えられる。治療法の変化の影響を考え、死亡率低下に関係しているか検証してみた。化学療法については抗がん剤の治療効果が死亡率低下に反映していない。2007 年に分子標的剤のような新薬が登場したが、対象者が少数のため、死亡率低下に繋がっていないと考えられる。便潜血検査が身体に対して非侵襲性であること、死亡率減少効果が研究結果から明らかであること、集団検診での費用が個別検診に比し安価であることを考慮すると、検診の有益性が受診率の向上に上手く活用されていないことが考えられる。それは地域住民に対して、検診の有益性を周知広報できていない地方自治体の問題でもあると考えられる。薬剤師として、例えば便通に関する問題を抱えている相談者に対して、検診を受けることの有効性を具体的な根拠を示して説明することは非常に有益である。

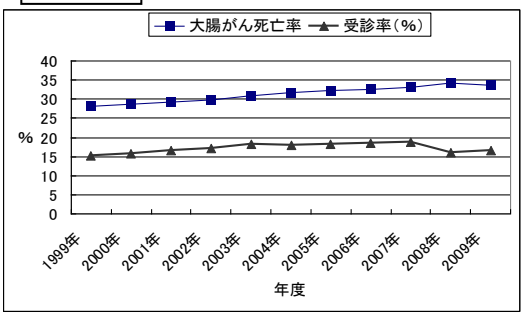
【参考 URL】Minds 医療情報サービス厚労省がん研究班編ガイドライン
http://minds.jcqhc.or.jp/stc/0028/1/0028_G0000070_GL.html
地域保健・健康増進事業報告 統計資料
http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/eStatTopPortal.do

(図 1)

表8 便潜血検査免疫法の症例対照研究

報告者	報告年	文献NO	方法	検討症例数		対象年齢	大腸がん死亡率減少効果	
				症例	対照		検診からの期間	オッズ比 (95%CI)
Hiwatashi	1993	47	化学法＋免疫法	28	84	45-69歳	36ヶ月以内	0.24 (0.08-0.76)
Saito	1995	48	免疫法	193	577	40-79歳	12ヶ月以内	0.40 (0.17-0.92)
			免疫法	164	467	40-79歳	24ヶ月以内	0.39 (0.12-1.33)
Zappa	1997	25	化学法＋免疫法	206	1030	41-75歳	36ヶ月以内	0.54 (0.3-0.9)
Saito	2000	49	化学法＋免疫法	51	152	40歳以上	12ヶ月以内	0.20 (0.08-0.49)
			化学法＋免疫法	42	86	40歳以上	24ヶ月以内	0.17 (0.04-0.75)
			免疫法	28	83	40歳以上	12ヶ月以内	0.19 (0.05-0.70)

(図 2)



卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006－137	氏　名	前田　美月
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	季節性インフルエンザワクチンの妊婦投与を推奨すべきか		

【目的】インフルエンザが流行る季節が近づくと、インフルエンザワクチンについて妊婦からの問い合わせが増える。「接種を奨める」「接種は避けた方が良い」など医師によりいくつかの意見がある。妊婦のワクチン接種を推奨すべきかどうかを検討する。

【方法】日本、海外における妊婦に対するインフルエンザワクチンの評価の違い、ワクチン接種によるリスクを調査・比較し、評価した。

【結果】国内においてインフルエンザワクチンは統計的にも予防効果は明確で、非接種者は接種者に比べ 260 倍死亡率が増加した(図１)。日本では妊婦のインフルエンザワクチン接種を推奨はしていないが、米国では米国疾病管理センター（CDC）によるインフルエンザ予防のためのガイドラインより、インフルエンザウィルスに感染すると妊娠後期にある妊婦は産後の女性と比べて重症化するリスクが 4.7 倍増加するとし(図２)、2004 年から妊婦のワクチン接種を強く推奨している。妊婦に対するインフルエンザワクチン接種は、米国では 2000 症例以上の安全性の報告があり、また国内では国立成育医療センターによる調査研究により 182 症例において安全性が確認されている。

（図１）

ワクチン接種者/非接種による比較

	接種	非接種
インフルエンザ罹患率	4．8%（696/14364）人	6．6%（206/3101)人
副作用	0.0005%（107症例/1900万本）	ー
死亡	0.000027%（1/380万）人	0.007%（1/14,514）人
後遺症	0.000043%（1/237.5万)人	

（図２）

TABLE 2. Odds ratio* for any cardiopulmonary event occurring during influenza season among women aged 15–44 years enrolled in the Tennessee Medicaid program, by pregnancy status, 1974–1993

	Pregnancy status	Prevalence (%) Cases (n = 4,369)	Prevalence (%) Controls (n = 21,845)	OR†	95% CI†
産後	Postpartum	4.4	7.7	1.0‡	
	Nonpregnant	86.6	85.3	1.11	0.94–1.32
妊娠前期	Week 1–7	0.7	1.1	1.06	0.68–1.67
	Week 8–13	0.7	1.0	1.23	0.79–1.93
	Week 14–20	0.9	1.2	1.44	0.97–2.15
	Week 21–26	1.2	0.9	2.52	1.74–3.65
	Week 27–31	1.3	0.9	2.62	1.82–3.76
	Week 32–36	2.0	1.0	3.21	2.32–4.44
妊娠後期	Week 37–42	2.2	0.9	4.67	3.42–6.39

* Odds ratios were adjusted for all factors listed in table 3.
† OR, odds ratio; CI, confidence interval.
‡ Referent.

産後に比べて 4.7 倍リスクUP！

【考察】妊婦は医学的、統計的にもインフルエンザ感染により重症化のリスクが高くなること、またインフルエンザワクチンは不活化ワクチンであり、ワクチン接種による母体や胎児への影響は極めて低いと考えられ、日本でも妊婦におけるインフルエンザワクチンの接種を推奨すべきであると考える。

【参考文献】

American Journal of epidemiology　Vol. 148, No. 11　*Printed in U.S.A.*

感染症学雑誌　第 34 巻　第 4 号　449～453.2010

【参考 URL】

国立感染症研究所　感染症**情報センター**：http://idsc.nih.go.jp/index-j.html

インフルエンザ予防接種ガイドライン：http://www.mhlw.go.jp/topics/bcg/tp1107-1e.html

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-142	氏　名	山崎　摩耶
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	肺がんにおけるがん検診の有益性		

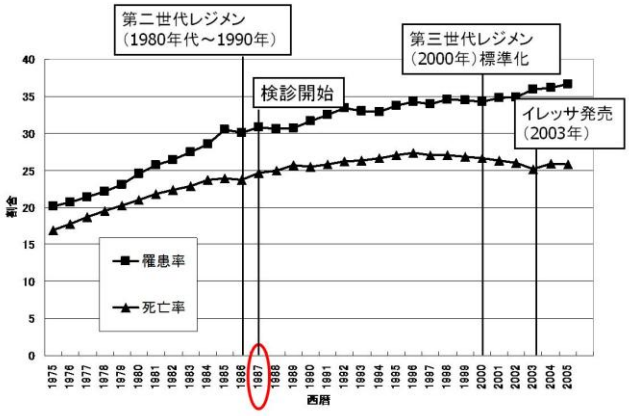
【目的】肺癌による死は日本の全がん死の 19%を占め、男性では全がん死の中で死因が第一位であり、女性では大腸癌・胃癌に次いで 3 番目を占めている。ところが、胸部X線検査・喀痰細胞診による肺癌発見率は 0.05%と低率である。そこで、肺がん検診が二次予防に本当に有効であるのかを検証した。

【方法】国立がん研究センターがん対策情報センターのデータをもとに肺がん検診が開始された 1987 年以前と以後の罹患率、死亡率の上昇値を比較した。また、その得られた結果にどのような要因が絡んでいるのかを検討する。

【結果・考察】Fig.1 から、罹患率・死亡率は 1987 年以降傾きが小さくなり、特に死亡率についてはほぼ横ばいになるグラフが得られた。これは検診開始時期と一致しているので、一見有効性があるようにみえる。次に肺がんに対する薬剤の発売時期と死亡率を比較したところ、薬物による影響も重複しており(Fig.1)、肺がん検診の効果とは言い切れない。

日本の肺がん検診ガイドラインでは肺がん検診は有効であると評価しているが、その根拠となる研究方法はすべて症例対照研究である。一方、アメリカでは肺がん検診に有効性はないと評価しており、その根拠となる研究方法はすべて無作為化比較試験である(Fig.2)。これら二つの方法を比較すると日本の有効性評価の根拠となる研究方法は信頼性が低いと考えられる。

以上の結果から、薬物療法による影響と肺がん検診の根拠となる研究方法は信頼性が低いことが考えられるため、肺がん検診が死亡率の低下に有効性があるかどうかは疑問が残る。日本でもアメリカと同じように無作為化比較試験による検討が必要だと考えられる。



※対人口 10 万人年齢調節罹患率・死亡率（昭和 60 年モデル人口）

(Fig.1)罹患率・死亡率と化学療法が行われた年代との比較

	日本	アメリカ
採用データ	症例対照研究	無作為化比較試験
有効性あり	4 /5 報	0/4 報

(Fig.2)日本とアメリカにおける研究デザインの比較

【参考文献・URL】

有効性評価に基づく肺がん検診ガイドライン
地域保健・老人保健事業報告 http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/32-19.html#
国立がん研究センターがん対策情報センターhttp://ganjoho.jp/professional/index.html

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-176	氏　名	冨永　瑶子
所属研究室	機能形態学研究室		
研究テーマ	40 歳代日本人女性に対する定期的なﾏﾝﾓｸﾞﾗﾌｨ検診は推奨すべきか		

[目的]乳がんは、年々増加傾向にあり女性では罹患率第一位となっている。早期発見が重要となり、現在、厚生労働省により 40 歳以上を対象として 2 年に 1 回の定期的な乳がん検診が推奨されている。一方、罹患率の高い米国において、対象年齢は 50 歳以上とするという新しい乳がん検診ガイドライン(2009 年)が発表された。そこで、日本でも 50 歳に引き上げるべきか、40 歳のままでいいかどうかを検討する。

[方法]40 歳から検診を受けることによる不利益を検討し、乳がんの死亡率減少という利益と比較検討した。

[結果・考察] 日本では問診と視触診による検診を行っていたが、2000 年に 50 歳以上を対象にﾏﾝﾓｸﾞﾗﾌｨ検診が導入された。ﾏﾝﾓｸﾞﾗﾌｨ検診が有効であれば死亡率が減少するはずである。しかし、ﾏﾝﾓｸﾞﾗﾌｨ検診導入後の死亡率の推移に変化が認められないことから(図 1)、50 歳以上を対象とした検診は有効ではないと考えられる。その後 2004 年からは対象年齢を引き下げて 40 歳以上が対象となった。これに関しては現時点では死亡率データは報告されていない。次に、米国と日本で罹患率が上昇する年齢を比較すると米国は 60 歳代、日本は 40 歳代であった(図 2)。以上のことから日本においては 50 歳以上のﾏﾝﾓｸﾞﾗﾌｨ検診は有効ではないと考えられるが、罹患率のピークが 40 歳代であることを考慮すると現在推奨されている 40 歳のままでよいと考える。

図 1

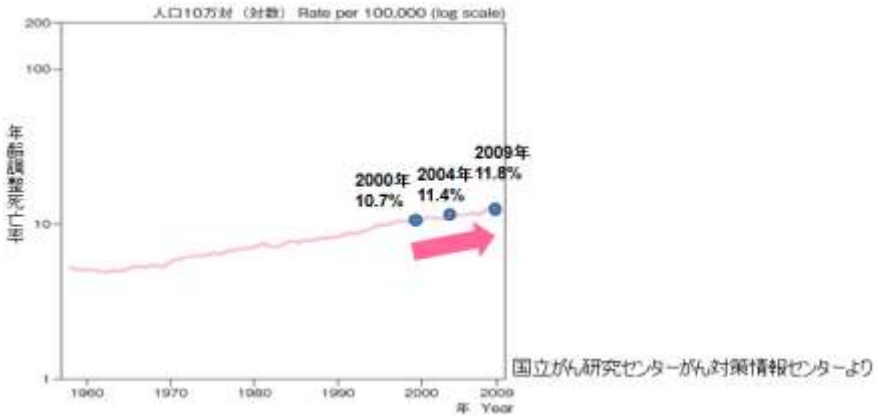
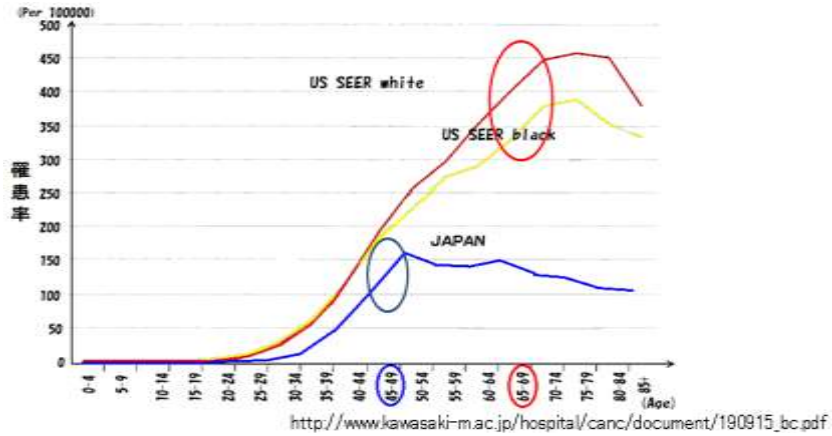


図 2



http://www.kawasaki-m.ac.jp/hospital/canc/document/190915_bc.pdf

卒業論文（2011 年度）

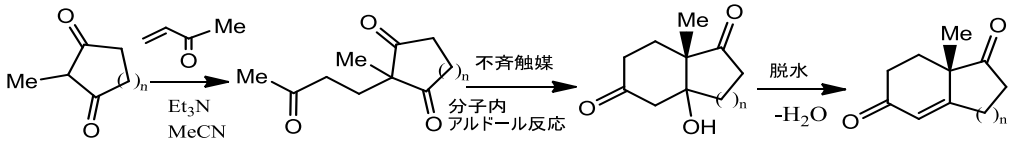
学籍番号	PC2006-018	氏　名	木村　莉菜
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	分子内不斉アルドール反応を利用する光学活性な二環性化合物の合成の検討		

【目的】光学活性な Hajos-Parrisch ケトン(1a)や Wieland-Miescher ケトン(1b)は、抗がん剤タキソールや骨粗鬆症薬として期待されているノルゾアンタミンなど多くの有用な天然物の合成原料に使用されている。トリケトン(3a,b)から 1a,b への分子内アルドール反応は多数報告されているが、反応が長時間である、化学収率・不斉収率が十分でないなど改良するべき点が残されている[1)]。今回これらの問題を解決するため、トリケトン(3a,b)の分子内不斉アルドール反応における新規不斉触媒の探索を行った。

【方法・結果】原料合成となるトリケトン(3a,b)は、ジケトン(2a,b)をアセトニトリル中でトリエチルアミン存在下メチルビニルケトンと室温で反応させ合成した。

従来の報告より、不斉触媒にはプロトン部位とアミノ基部位が必要とされている[1)]。そこで、アミノ酸触媒として市販の(*S*)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸(A)(20mol%)を用い、アセトニトリル中で五員環ケトン(3a)を加熱還流にて 21 時間反応させたところ、(*S*)-1a が 84%ee(収率 40%)で得られた。六員環ケトン(3b)を同条件下で反応させたところ、(*S*)-1b が 51%ee(収率 45%)で得られた。次に、カンファー化合物は立体障害が大きく選択性に影響を及ぼすと予想し、カンファーアミンから誘導した新規な触媒(B)(10mol%)を用い、3a および 3ｂをクロロホルム中室温で 27~30 時間反応させたところ、1a が 45%ee（収率 16%）1ｂは 16%ee(収率 22%)で得られた。低収率の原因として反応中間体の β-ヒドロキシケトン(4a,b)からの脱水反応が完全に進行していないと(HPLC の４つのピークから)判断し、1a,b を分離後の残渣を脱水条件で反応させることで、さらに 1a を 13%の収率で得ることができたが ee は 14%であった。同様に 1b では収率 19%(1%ee)となった。

【結論】今回の実験では、アミノ酸触媒(A)からは二環性ケトン(1a,b)が中～高い、カンファー触媒(B)では低～中程度の(*S*)-選択性が得られることがわかった。用いた触媒(A,B)は十分な触媒能ではなかったが、置換基の検討により触媒活性が上がることが期待される。



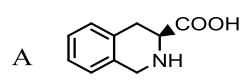
2 a: n=1
b: n=2

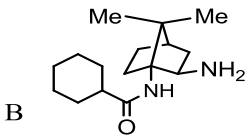
3 a: n=1 (55%)
b: n=2 (96%)

4 a: n=1
b: n=2

1 a: n=1
b :n=2

不斉触媒





1a　84%ee(S) (40%)
1b　51%ee(S) (45%)

45%ee(S) (16%)
16%ee(S) (22%)

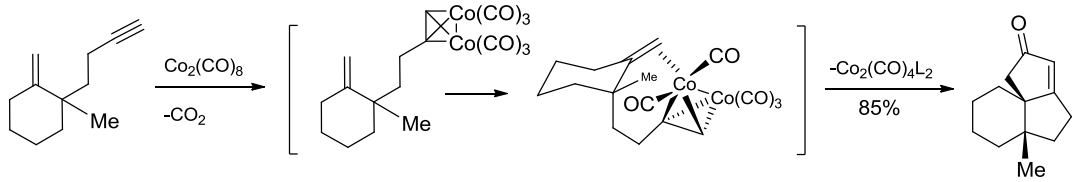
【参考文献】1) S. G. Zlotin, *et. al*, *Russ. Chem. Rev.*, **2009**, *78*, 737.

卒業論文（2011 年度）

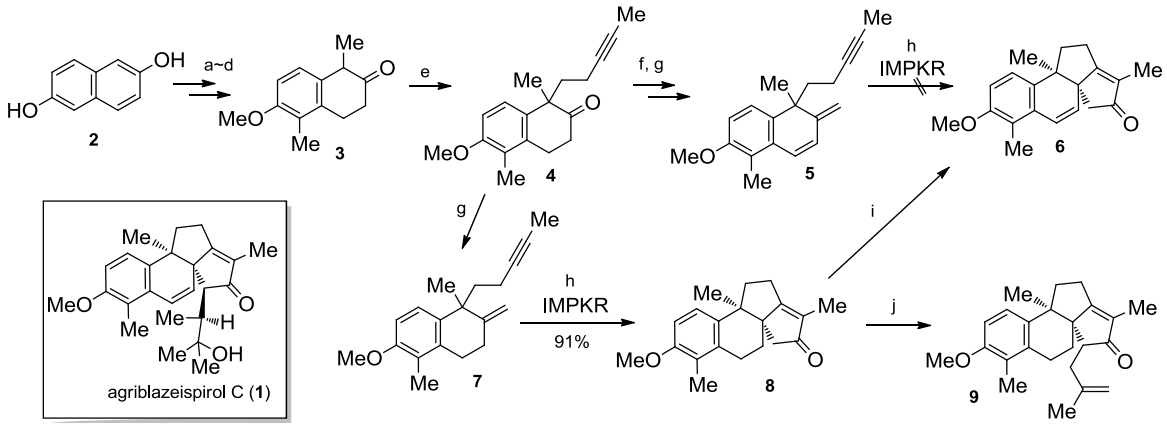
学籍番号	PC2006-019	氏　名	黒澤　結佳
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	Agariblazeispirol C の全合成研究		

【目的】Agariblazeispirol C (**1**)は、ヒメマツタケ（*Agaricus blazei*）の培養菌糸体から抽出単離された、新規な四環性骨格をもつテルペノイドである[1)]。その単離収率は 0.00031%と非常に低く、生物活性も報告されていないため、今回、ジコバルトオクタカルボニル[$Co_2(CO)_8$]を用いる分子内 Pauson-Khand 反応（IMPKR）[2)] を鍵反応とする合成を検討した。

Pauson-Khand 反応



【方法・結果】2,6-ジヒドロキシナフタレン(**2**)から数工程を経てケトン(**3**)を合成した。**3** へのアルキニル部分の導入の条件を検討したところ、−20℃下、塩基として NaH を使用することで収率良く進行することが分かった。さらに 2 工程（エノンへの変換、Wittig 反応）により環化前駆体となるジエンイン(**5**)へ変換した。**5** の環化反応を種々条件で検討したが目的とする **6** を得ることはできなかった。そこで、エンイン(**7**)を合成し、Pauson-Khand 反応に付したところ、トルエン中で加熱置流することで目的とする四環性化合物(**8**)を 46%で合成できた。さらに、反応条件を検討したところ、シクロヘキシルアミンを添加した場合 91%の収率で **8** が得られることが分かった。この **8** にオレフィン部を導入して **6** へと変換できた。また、**7** への側鎖の導入も検討し、**8** を合成することができた。



Reagent: a) K_2CO_3, MeI b) $POCl_3$, DMF; NH_2NH_2, KOH c) Na, ^{i}AmOH; HCl d) pyrolidine, MeI e) NaH, 5-iodo-2-butyne f) $PyHBr_3$; DBU g) Ph_3PMeBr, tBuOK h) $Co_2(CO)_8$ i) NBS; DBU j) NaH, 3-chloro-2-methylpropene

【結論】2,6-ジヒドロキシナフタレン(**2**)から誘導したエンイン化合物(**7**)の分子内 Pauson-Khand 環化反応により四環性化合物(**8**)を収率良く合成できた。さらに二重結合の導入より **1** のもつ骨格(**6**)への変換もできた。また、**8** への側鎖部分の導入にも成功した。

【参考文献】1) M. Hirotani *et al., Tetrahedron*, **2005**, *61*, 189. 2) M. Ishizaki *et al., Tetrahedron*, **2001**, *57*, 2729.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-067	氏　名	久場　弘太
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	何故ジェネリックは普及しないのか？～今日のジェネリック医薬品～		

【目的】今後高齢化が進みますます高齢者が医療機関に関わる機会が増える。厚生労働省の調査では国民医療保険は年間３５兆円にのぼり、そのうちの１５％を薬剤費が占めている。薬剤費を節約すれば医療費削減に繋がる事になり、そうした面で大きく期待されているのがジェネリック医薬品である。ジェネリック医薬品とは新薬と同成分・同効果を示し価格が新薬の２～７割に設定された薬である。ジェネリックを上手く活用できれば医療費を抑えることができる。欧米のジェネリック普及率は６０％以上あるのに対し日本の普及率は約２０％と低いシェアに留まっている。行政の後押しがあるにも関わらず何故普及しないのかその原因について調査した。また先発薬と差別化を図るために今日のジェネリックはどのような工夫が施されているか調査した。

【方法】指導薬剤師の助言,著書,厚生労働省のホームページ,ジェネリック製薬協会のホームページを使って調査した。

【結果・考察】ジェネリック普及率【過去５年間】

	2005	2006	2007	2008	2009
数量ベース	１７.１％	１６.９％	１７.２％	１７.６％	２０.３％
金額ベース	５.１％	５.７％	６.２％	６.８％	８.５％

（日本ジェネリック製薬協会調べ）

主な原因として医師,薬剤師,製薬会社,行政それぞれに問題がある事がわかった。

医師：知識不足。品質への不安。先発メーカーとの長い信頼関係。薬剤師：ジェネリックを置くスペースがない。注文数が少ないため在庫になりやすい。低価格による薬価差が小さい事。患者：品質への不安。ブランド指向が強い。製薬会社：MR 不足（情報提供不足）。中小企業が多い事による供給面の不安定さ（在庫が少ない）行政：医師、薬剤師に対してインセンティブを与えるタイミングが遅い。インセンティブが諸外国に比べ低い。

今日のジェネリック医薬品は新たな製剤工夫を施し新薬との差別化を図っているものがある。患者が服用しやすいようにカプセルを錠剤化したり錠剤を小型化している。苦味を感じる薬剤は糖衣やフィルムコーティングで味を改良している。又調剤しやすいように割線に工夫したり冷所保存であったものを室温保存可能にするなど安定性を改善している。

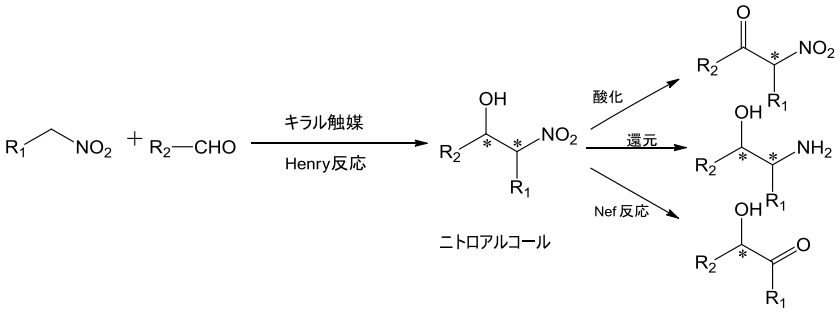
【考察・結論】ジェネリック普及率は年々増加しているが大きな変化は見られない。医師,薬剤師,患者はジェネリックに関してまだ偏見があるためである。３者の意識改革が必要だろう。しかし一番の根本的原因は医師、薬剤師へのインセンティブが低い事にある。ジェネリックを更に普及させるためには診療報酬を改定しインセンティブを増やす施策が必要である。また、今日のジェネリックは新薬にはない付加価値をつけることで患者、医療関係者にも扱いやすくなっている。今後更にジェネリックのニーズが高まるきっかけにもなるだろう。

【参考文献】（医薬品業界 2010 の攻防・はる出版）（ジェネリック革命・IN 通信社）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-074	氏　名	菅谷　香織
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	不斉 Henry 反応（ニトロアルドール反応）に関する研究		

[目的]　Henry 反応はアルデヒドへのニトロアルカンの求核付加反応であり、生成物のニトロアルコールは種々の有用な化合物に変換できる。光学活性なニトロアルコールは、医薬品や天然物の合成原料として有用であるため、不斉 Henry 反応におけるキラル触媒の合成・探索を行った。



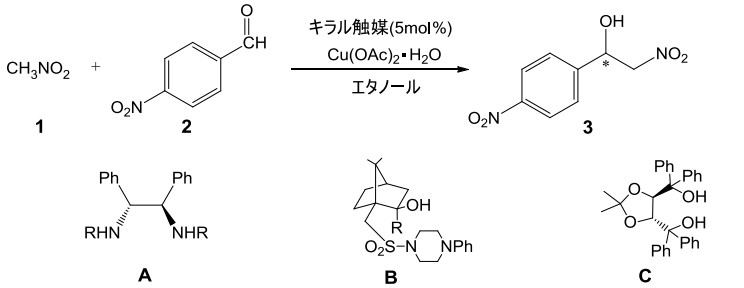
[方法]　エタノール溶媒中で触媒量(5mol%)のキラル触媒存在下で、ニトロメタンと *p*-ニトロベンズアルデヒドを室温下、窒素雰囲気で 24 時間撹拌した。その後、抽出・精製を行い、液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、生成物の不斉収率を決定した。

[結果]　構造の異なるキラル触媒(A、B、C)を用いた結果を以下に示す。

ジアミン型キラル触媒(A)では１級アミン(a)より２級アミン(b)の方が、立体選択性が向上する事が分かった。これはアミン付近の立体障害が大きくなったためと考えられる。一方、アミノアルコール型触媒(B)を用いた場合には２級アルコール(a)の方が、３級アルコール(b)よりも不斉収率が高かった。アルコール付近がかさ高くなり、不斉識別に有効な空間差が小さくなったためと考えられる。ジオール型触媒(C)を用いた場合、最も高い立体選択性で生成物が得られることが分かった。

Henry 反応ではアミンの添加により反応が加速されることが知られているので、不斉収率が最も良かった触媒 C を用いて、エチルジイソプロピルアミンなどのアミン類を加えた反応を検討した。期待した通り、アミンの添加により反応収率は良くなったが、不斉収率が低下したことから、使用したアミンは触媒 C を用いた時には、2 に対する付加において一定方向からの反応を邪魔してしまう事がわかった。

[結論]　今回の結果から TADDOL 型ジオール触媒が最も有効であることが分かった。アミン類の添加により収率は向上したが、不斉収率は低下した。不斉収率を低下することなく、収率を向上させるアミン類の検討が今後必要である。



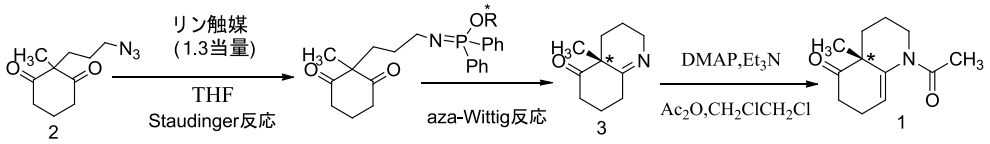
a : R = H　収率42%　8%ee(*R*)　　**a** : R = H　収率23%　25%ee(*R*)　　収率32%　55%ee(*S*)
b : R = Me　収率66%　44%ee(*R*)　　**b** : R = Ph　収率27%　1%ee(*S*)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-094	氏　名	柳谷　麻里
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	分子内不斉 aza-Wittig 反応を利用する光学活性な含チッ素二環性化合物の合成の検討		

【目的】自然界には数多くの含チッ素天然物が存在しており、これらの天然物を元に開発された医薬品も多い。今回、キラルなリン触媒を用い、アジドケトンの Staudinger 反応、それに続く aza-Wittig 反応による分子内不斉環化反応を経て、光学活性な二環性含チッ素化合物(1)のエナンチオ選択的合成探索をする。

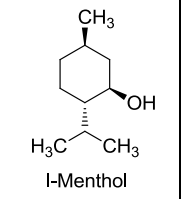
【方法】原料であるアジドケトン(2)は 2-メチルシクロヘキサンジオンから 2 行程で合成した。アジドケトンの不斉 aza-Wittig 反応は以下の手順で行った。まず、窒素条件下 0℃でキラルなアルコールから BuLi、Ph_2PCl を用いてキラルなリン触媒を合成し、室温でアジドケトン(2)からの aza-Wittig 反応を行った。環化体(3)は加水分解を受けやすいため、アセチル化を行い、1 へ誘導後、液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて不斉収率を決定した。



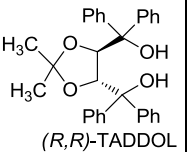
【結果と考察】当初、ℓ-menthol から合成したリン触媒をカラム精製の後に反応に用いたが、2 の Staudinger 反応が進行しなかったことから、後処理または精製中に 5 価のリンに酸化されている可能性が考えられた。そこでリン触媒を取り出さずにワンポットで行うことにした。ℓ-Menthol、BuLi、Ph_2PCl を用いてリン触媒を合成し、ワンポットでアジド 2 と反応させたところ、目的物(1)が収率 38%、17%ee で得られた(実験①)。また、触媒合成時の温度を室温と 80℃で行い、それぞれを 2 と反応させたところ、前者の方が収率・ee 共に良い結果が得られた(実験①②)。キラルなリン触媒合成時に使用する塩基を BuLi と EtN_3 で比較してみたところ、BuLi の方が収率が高いことが分かった(実験①③)。$PhPCl_2$ を用いた場合には、生成物はほとんど得られなかった(実験④)。さらに、その他の様々なキラルなアルコールを用いて反応を検討した結果、 *(R,R)*-TADDOL の場合に最も良い不斉収率(29%ee)で反応が進行した(実験⑤)。

【結論】ℓ-Menthol を使用した場合、Ph_2PCl・BuLi を用いて aza-Wittig 反応を行ったとき、不斉収率、ee ともに良い結果が得られることが分かった。また、*(R,R)*-TADDOL が最も良い結果を得たので、類縁体を検討することで選択性が向上する可能性がある。

	ℓ-menthol				*(R,R)*-TADDOL	
実験	①	②	③	④	⑤	⑥
リン	Ph_2PCl	Ph_2PCl	Ph_2PCl	$PhPCl_2$	Ph_2PCl	Ph_2PCl
塩基	BuLi	BuLi	Et_3N	Et_3N or BuLi	BuLi	Et3N
温度	r.t.	80℃	r.t.	r.t.	r.t.	r.t.
収率(%)	38	17	trace	trace	22	29
ee(%)	17*(R)*	14*(R)*			29*(R)*	21*(R)*



I-Menthol



(R,R)-TADDOL

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-117	氏　名	斉藤　智秋
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	医薬品の副作用と構造の相関		

【目的】すべての医薬品には目的とする薬理作用だけではなく必ず副作用が存在し、その薬理作用や副作用は化学構造と密接に関係している。そこで医薬品の構造から副作用を推測する事が出来るのではないかと考えた。本研究では医薬品の構造から副作用を予測する事を目的に、構造が類似した医薬品に同様の副作用がないか、同じような副作用がある医薬品に構造上の相関がないかを調査し考察した。

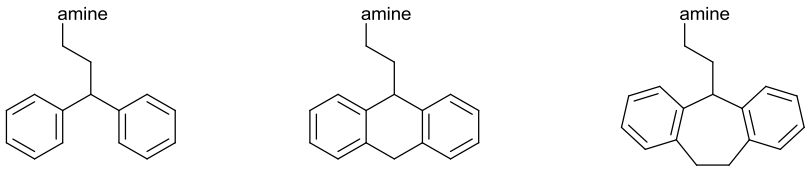
【方法】主に医薬品医療機器情報提供ホームページより医薬品の添付文書を検索し、化学構造と副作用を調査した。

【結果・考察】まず、第一世代抗ヒスタミン薬、三環系抗うつ薬、抗精神病薬のフェノチアジン誘導体、非定形抗精神病薬の構造が非常に類似している事を見出した。それぞれ、ヒスタミン H_1 受容体拮抗、セロトニン・ノルアドレナリンの再取り込み阻害、ドパミン D_2 受容体、セロトニン５HT_2 受容体遮断を主作用としているが、主な副作用は眠気、口渇・排尿困難などの抗コリン作用、アドレナリン α_1 受容体遮断による起立性低血圧等、共通するものが多く見られた。

次に、これらの共通構造のどの部分が副作用発現と関係しているのかを確認するため、主作用が抗ヒスタミン薬、抗コリン薬、アドレナリン α_1 受容体遮断薬として使用されている医薬品の構造と比較したところ、一部のアドレナリン α_1 受容体遮断薬と抗ヒスタミンは下図に示すジベンジルや三環構造を持つ事、抗ヒスタミン薬と抗コリン薬は２～５の複素原子を含む直鎖炭素の先にアミンが結合していることなどの共通点あり、これらの部分がそれぞれの副作用発現と関係していると推定される。また、抗ヒスタミン作用は直鎖炭素が２～３の時に最も強く、抗コリン作用はアミンの級数が大きい程強い事が分かった。第二世代の抗ヒスタミン薬や抗うつ薬ではアミン部分を環化する、三環部分を四環にする等の構造変化によりこれらの副作用を軽減した。

今回の調査では耐糖能異常、横紋筋融解症、間質性肺炎等の共通の副作用から構造の相関を見つけることは出来なかった。これまで薬剤師を含め多くの医療従事者は薬効毎に薬を暗記して来た傾向があるが、構造にも着目し医薬品を分類していくと副作用も理解しやすくなる。また、今回の調査に使用した医薬品の添付文書の構造式は製薬会社がそれぞれ独自に製作しており、向きなど書き方に統一性がなく一見すると同種の構造だと分かりにくいため、構造式の書き方も先行している製薬会社に統一する等、見やすくする工夫も必要だと感じた。

第一世代抗ヒスタミン薬、三環系抗うつ薬、抗精神病薬に見られる共通構造



卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-152	氏　名	浮谷　良輔
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	抗結核作用を有する海産テルペノイド　ElisabethinC 及び ElisapterosinB の全合成研究		

【目的】Elisabethin C 及び elisapterosin B は Rodriguez らにより、カリブ海に生育する海綿 *Pseudopterogorgia elisabethae* から単離されたテルペンである。これらの化合物は、*Mycobacterium tuberculosis H37Rv* に対して、12.5ug/mL で 42%(elisabethin C)及び 79%(elisapterosin B)の阻害活性を有する。当研究室ではシクロヘキセノン 1 からエンイン化合物 2 を経由し、Pauson-Khand 反応を利用して三環性化合物 **3** の合成に成功している。今回、**3** から elisabethin C 及び elisapterosin B への変換を検討した。

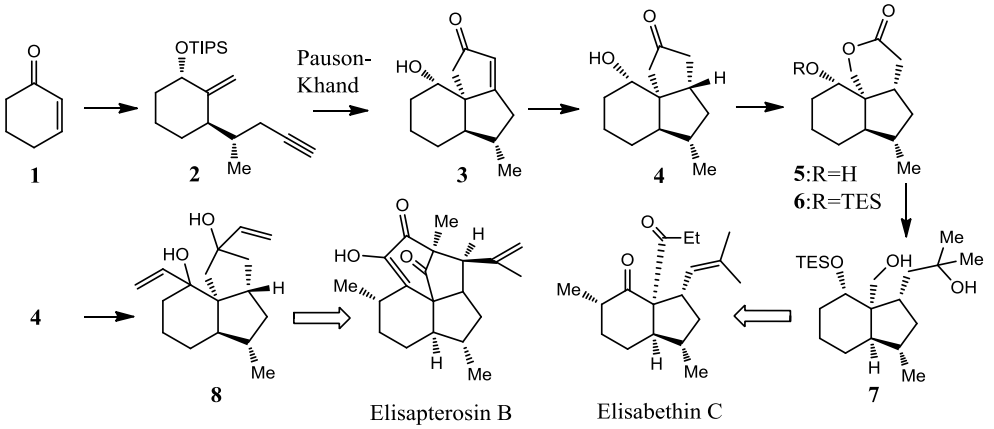
【方法・結果】1) Elisabethin C の合成研究

すでに確立したルートに従い、**1** からエンイン化合物(**2**)を経て三環性化合物(**3**)を合成した。まず、エノン(**3**)に接触還元を行いケトン(**4**)を得た。この **4** を m-クロロ過安息香酸(MCPBA)と反応させた後に、水酸基をトリエチルシリル(TES)基で保護して環状エステル(**6**)へ 91%の収率で変換できた。**6** の合成は **4** に TES 基を導入した後に MCPBA と反応させるルートでも試みたが、生成物 **6** の収率は 11%であった。副生成物として **6** と逆に転位した環状エステルが前者のルートで 2%、後者のルートで 20%生成したため、アルコール(**5**)を経由するルートの方が良いことが分かった。次に環状エステル **6** に MeMgBr を反応させてジオール **7** を合成できた。今後、**7** に対する Dess-Martin 試薬を用いた酸化反応などにより全合成が達成できると考えられる。

2) Elisapterosin B の合成研究

4 を Dess-Martin 試薬によりジケトンに酸化した後、Grignard 反応を用いてオレフィン部分を導入した **8** を立体異性体の混合物として 40%で得た。この反応を塩化亜鉛存在下で行ったところ、48%に収率が向上した。**8** に対し第一世代及び第二世代の Grubbs 触媒を用いてオレフィンメタセシス反応による変換を試みたが、四環性化合物は得られなかった。**8** には 4 つの立体異性体が存在し、2 つのビニル基が近傍に位置する異性体が生成していない可能性があるため、今後ジケトンから **8** への立体性選択的な反応を検討する必要がある。

【結論】三環性化合物(**3**)から、elisabethin C 及び elisapterosin B の合成中間体であるジオール **7**,**8** への変換に成功した。



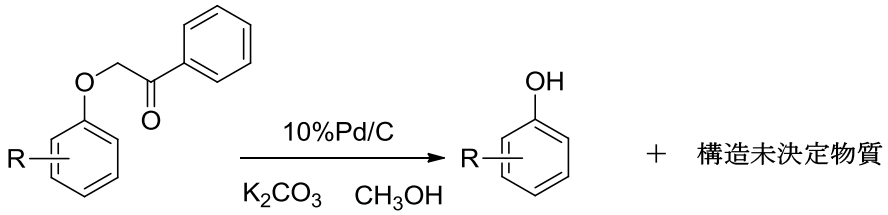
卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-199	氏　名	中山　陽介
所属研究室	薬化学研究室		
研究テーマ	「Pd/C を用いた C-O 結合の開裂反応」 ～反応条件としての酸素の必要性の検討～		

【目的】当研究室では塩基性条件下でエーテル C-O 開裂反応が進行することを見出している。本開裂反応が酸化的脱離により進行している可能性を考え、条件としての酸素の必要性を決定づけるための検討をした。

【方法】エーテル基質 100mg に対し CH_3OH 溶媒中 10%Pd/C 20mg と K_2CO_3 500mg を添加し、常温で酸素雰囲気下、空気雰囲気下、窒素雰囲気下の 3 種類の条件で反応を行い、生成物の収率を求めた。

【結果】



原料（R=p-CN, p-NO_2, m-NO_2, p-Br, p-OCH_3, p-tBu）

基質として p-CN 体を用いた場合、酸素雰囲気下の反応では 30 分後に薄層クロマトグラフィー(TLC)上で出発物質が消失したことを確認し、後処理後 p-シアノフェノールを 96%の収率で得た。空気雰囲気下の同様な反応では、1 時間 30 分に 92%の収率でフェノール体が生成した。窒素雰囲気下においては、反応開始後 1 時間 30 分を過ぎても TLC 上で出発物質の消失を認めなかったため、さらに 1 時間反応を行った。しかし、TLC でほとんど変化が無かったため、反応を停止し、後処理後に分取薄層クロマトグラフィー (PTLC)により分離精製を行ったところ 11%の目的物が得られた。この際、出発物質と想定したスポットの NMR 解析より出発物質ではないことが判明した。

反応における生成物の収率は以下の表に示す通りである。

条件	時間（hr）	収率（%）	構造未決定物質（mg）	原料回収量(%)
酸素雰囲気下	0.5	96		
空気雰囲気下	1.5	92		
窒素雰囲気下	2.5	11	24	57

【考察】この副生成物は NMR により原料の δ 5.4ppm 付近の 2H 分のピークが消え、新たに δ 6.0ppm 付近に 1H 分のピークが出ていることからカルボニルの α 位に電気陰性度の大きい原子が 1 つ導入されることが考えられたが現在まで構造は決定できていない。同様の結果が他置換の原料を用いた反応でも得られた。

【結論】酸素雰囲気下、空気雰囲気下ではフェノール体が高収率で生成するのに対して窒素雰囲気下で 11%の収率にとどまったので、本反応において酸素の存在が反応の進行に相関していることがわかった。

【参考文献】1)金丸裕子　卒業論文(2007)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-013	氏　名	大平　剛志
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	小学生児童を対象とした食行動に影響する要因の検討		

【目的】本研究では、小学生児童の「健康的な食生活」に関する行動変容段階と栄養素等摂取量および社会的・心理的要因との関連性、また児童と保護者の行動変容段階間の関連性などを明らかにし、児童の食行動や栄養素等摂取量に及ぼす要因を抽出することを目的に行った。

【方法】千葉県T市内の小学校 1 校に在籍する 4～6 年生児童 185 名とその保護者を対象に、食生活に関する調査を行った。用いた調査票は「健康的な食生活」に関する行動変容段階と、心理的・社会的要因として、意思決定のバランス（食行動の恩恵・負担)、自己効力感、行動的スキル、ソーシャルサポート、食事の家事手伝い、食品利用環境、親子信頼関係に関する質問および食事に関する知識問題から構成される。保護者にも、同様に食生活に関する調査票への回答を依頼したが、本研究では「健康的な食生活」に関する行動変容段階のみを利用した。児童については食事調査（食物摂取頻度調査：エクセル栄養君 FFQver3.0）も併せて実施し回収率は 93.5%で、解析対象者は欠損値のない児童 171 名（92.4%)、保護者 137 名（74.1%）とした。なお本研究は城西国際大学倫理委員会の承諾を得て実施し、平成 22 年度東金市食育事業の一環として行った。

【結果】全児童における「健康的な食生活」に関する変容段階の分布は前熟考期 5 名（2.9%)、熟考期 43 名（25.1%)、準備期 38 名（22.2%)、実行期 36 名（21.1%)、維持期 49 名（28.7%）であり、前熟考期が 5 名と少ないため、以下の解析は前熟考期と熟考期を併せて解析を行った。その結果、多くの栄養素摂取量で維持期は前熟考期＋熟考期に比べ有意な高値を示した。適正な栄養素量を摂取している児童の割合においては、有意な差が見られるものは少なかったが、「健康的な食生活」に関する行動変容段階が後期段階に移行するほど増加する傾向が見られた。また変容段階と心理的・社会的要因との間には食行動の恩恵、自己効力感、ソーシャルサポート、食品利用環境、親子の信頼関係で有意差が確認された。親子の行動変容段階の関係では、維持期における児童の半数以上で保護者の変容段階も維時期にあることが確認された。

【結論・考察】小学生児童における「健康的な食生活」に関する行動変容段階の妥当性が、栄養素等摂取量および適正栄養素摂取者の割合を基準関連尺度として確認された。また「健康的な食生活」に関する行動変容段階は、さまざまな社会的・心理的要因の影響を受けることが示唆された。今回の結果から児童の「健康的な食生活」を実現するために、関係性が確認された社会的・心理的要因を強化した支援が有効であると考えられる。しかしながら本研究では、対象校が 1 校で標本数も少なく一般化が困難などの課題が残った。今後は標本数を拡大し、併せて本研究に用いた社会的・心理的各要因尺度の信頼性およぶ妥当性の検討などを行っていく必要があると考える。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-040	氏　名	本田　智美
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	小学生児童を対象とした食支援の影響		

【目的】小学生児童を対象に健康的な食生活を定着させることを目的に、児童および保護者への栄養教育の提供が、児童の行動変容段階および心理的・社会的要因や栄養素等摂取量に及ぼす影響について検討した。

【方法】千葉県 T 市内の小学校 1 校に在籍する 4〜6 年生児童 185 名及びその保護者を対象に介入研究を実施した。事前に行った調査および教職員との打ち合わせにより、児童-保護者介入群 27 名（14.6%; Grp1）、保護者介入群 58 名（31.4%; Grp2）、無支援群 55 名（29.7%; Grp3）に割付けた。介入期間は平成 22 年 6 月から 12 月までの 6 ヶ月間で、具体的介入方法として、児童を対象に隔週で食と栄養に関するドリルワークを提供し、回収添削した後に翌週返却した（全 12 回）。また毎月設定目標に対する到達度を自己管理するセルフモニタリングシートを配布した。保護者には、隔週で食と栄養に関する情報レターを A4 サイズで 2 枚提供し、一般的な食や栄養に関する知識、お弁当の作り方、東金近郊の農作物などを紹介するものとした（全 12 回）。介入の効果測定は、大平（2011 年 JIU 卒論発表資料）が使用した調査票および食物摂取頻度調査（エクセル栄養君 ver.3.0）を用いて行った。得られたデータは反復二元配置分散分析を施し、各群の介入前後の比較は対応のある *t*-検定を行った。なお本研究は城西国際大学倫理委員会の承諾を得て実施し、平成 22 年度東金市食育事業の一環として行った。

【結果】Grp1 および Grp2 の健康的な食生活に関する行動変容段階における実行期・維時期の割合は介入前後で 77.0%から 46.2%、56.2%から 53.2%とそれぞれ低下した。一方、Grp3 では 34.6%から 50.0%に増加した。心理的・社会的因子においては、Grp1 では行動的スキル、食事の手伝いが、Grp2 では食品利用環境(菓子類)が介入前に比べて介入後で有意な高値を示し、Grp3 では、行動的スキルが有意な低値を示した。栄養素等摂取量については日本人の食事摂取基準に基づき、推定平均必要量もしくは目標量以上（耐容上限量が設定される場合はそれ未満）の者を適正摂取者とした。その結果、Grp2 のビタミン B_2 の適正摂取者の割合は介入後で有意に低下し、Grp3 のカルシウムにおいても同様の結果を示した。

【考察】本研究では、児童および保護者への栄養教育の提供が児童の健康的な食生活に関する心理的・社会的要因に影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、本研究では介入を行った Grp1 および Grp2 では健康的な食生活に関する行動変容段階の後期ステージの者の割合が介入実施により低下した。また本研究で確認された、介入により影響を受けた心理的・社会的要因は大平の報告する変容段階に関係性を示す要因とは必ずしも一致しなかった。これらの違いは、介入により対象者の「健康的な食生活」に関する認識に変化が生じた可能性が考えられる。また本研究は市の健康事業の一環として行ったため、無作為抽出による割付けが実施できず、各群の標本数にも偏りがあり、これら研究デザイン上の問題も結果に影響を及ぼしていることが考えられる。今後は、標本数を増やすことや無作為抽出による研究デザインで実施するなど、児童の健康的な食生活の定着に関しての研究を継続していく必要があると考える。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-053	氏　名	石坂　茉莉
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	ラットを用いた *in vitro, in vivo* での糖質の消化吸収評価系の検討		

【目的】糖尿病の患者数は近年急激に増加しており、糖尿病の予防は、今後のますます重要な課題となってきている。糖尿病の予防には血糖値を正常に保つことが重要である。そのために、食事・運動療法により血糖値をコントロールすることが基本とされている。しかし、「血糖値が気になる方に適する」保健の用途を持つ特定保健用食品（トクホ）も数多く開発されており、糖尿病予防への貢献が期待されている。こうしたトクホの関与成分の作用機作は、糖質の消化吸収阻害である。食品中に含まれる主たる炭水化物であるでんぷんや糖質を吸収するためには、糖質がα-アミラーゼやα-グルコシダーゼといった酵素によって単糖類にまで消化される必要がある。先の保健の用途を持つトクホのほとんどは、この酵素を阻害することで糖の吸収を遅延させて血糖値の上昇を緩やかにするというものである。臨床栄養学研究室において、このようなトクホの新たな関与成分のスクリーニングを行うために、糖質消化酵素のα-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ活性の阻害作用の *in vitro* および *in vivo* 定量的評価法を検討した。

【方法】*in vitro* の実験は次の方法で行った。まず、ラットの空腸近位半分を摘出し、粘膜をスライドグラスでこそぎ取り、その 4 倍量のリン酸緩衝液を加えてホモジナイズした。これを遠心分離し、上清を粗α-グルコシダーゼ溶液とした。基質としては、0.01M p-nitrophenyl D-glucopyranoside を用いた。この基質溶液量を固定し、先に調整した粗α-グルコシダーゼ溶液の希釈倍率を種々変化させた条件下で 400nm における吸光度の経時的変化を測定した。逆に、粗α-グルコシダーゼ溶液の希釈倍率を一定にして、基質濃度を変化させた条件下での 400nm における吸光度の経時的変化も測定した。鋭意検討の結果、最適な希釈倍率と基質溶液量を検討した。粗α-グルコシダーゼ溶液のたんぱく質含有量についても BSA を標準物質として BCA 法により定量した。

in vivo の実験として、ラットのでんぷん負荷試験を行った。すなわちラット 7 匹に、水溶性でんぷん溶液 1mL（0.34g/mL）をゾンデで胃内に投与し、投与後 0，15，30，60，120 分の各時点で尾採血し、血糖自己測定器（ワンタッチウルトラ）で血糖値を測定した。

【結果】*in vitro* の実験では、400nm における吸光度は経時的に直線的な上昇を示した。*in vivo* の実験では、血糖値は 30 分ないし 60 分でピークとなった。

【考察】酵素活性の測定はホモジナイズ後の上清 1mL を 12.5 倍に希釈し、0.01M の基質を 6.25mL 加え、30 分間の吸光度の経時変化の観察により可能となった。

被負荷成分をグルコースやマルトースではなくでんぷんとすることでα-アミラーゼ活性の評価を試みた結果、でんぷんでも血糖値が上昇し、評価可能であることが解った。このように、α-アミラーゼとα-グルコシダーゼが関与する糖質の消化過程の 2 段階を定量的に観察する系が確立できた。今後は、α-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼに対する阻害作用を持つ新規の食品成分の探索を行っていく予定である。

【参考文献】下田博司　他：日本栄養・食糧学会誌　Vol.51　279～287　(1998)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-063	氏　名	河村　愛加
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	鉄欠乏性貧血ラットを用いた大根葉中の鉄の生体利用性および FOS 摂取の影響		

研究概要

【目的】凍結乾燥粉末大根葉(以下 大根葉)は鉄を多く含有し、鉄補給用サプリメントの原料として用いられている。しかし、その鉄の生体利用性は確かめられておらず、私たちが行った予備試験では、生体利用性が低い可能性を示唆するデータを得ている。一方でミネラルの吸収促進作用を有するフラクトオリゴ糖(以下 FOS)には、鉄の吸収を促進する効果が確かめられている。そこで、今回は鉄欠乏性貧血ラットの貧血の回復を指標にして①大根葉中の鉄の生体利用性を評価すると共に②FOS 摂取による大根葉中の鉄の生体利用性に及ぼす影響を観察した。

【方法】ラットを鉄欠乏飼料により３週間飼育し、鉄欠乏性貧血ラットを作製した。貧血の発症状況を確認した後、平均体重、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値が等しくなるように、以下の４群(１群７～８匹)；対象食群(C 群)、対象食+FOS 群(CF 群)、大根葉群(D 群)、大根葉群+FOS 群(DF 群)に群分けした。鉄の供給源には、AIN-93G ミネラル混合(C、CF 群)ないし、大根葉(D、DF 群)を用いた。試験飼料により２週間飼育し３日間毎に尾静脈からの採血を行い、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。ヘモグロビン濃度は測定キット（ヘモグロビンテストワコー）を用い、ヘマトクリット値は血液をヘマトクリット毛細管に採取し 12000rpm にて 10 分間遠心分離を行い測定した。試験最終日にはラットをエーテル麻酔で屠殺後、盲腸を採取した。盲腸については内容物の pH をコンパクト pH メーター(TWINpH)で測定した。

【結果】ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値はいずれの時期においても C 群と CF 群の間に有意差はなく、試験終了時には両指標とも値が正常値まで上昇した。D 群と DF 群においては群間に有意差は認められず、両指標とも値は上昇しなかった。盲腸内容物の pH 測定は結果として、C 群に対して CF 群では有意な低下が認められたものの D 群と DF 群間では有意な変化は認められなかった。

【考察】今回の結果からは、予備試験で示唆された結果と同様に大根葉中の鉄は生体利用性が低く貧血の改善が認められなかった。また FOS 摂取によっても、大根葉中の鉄の生体利用性の改善は認められなかった。ラットに FOS を摂取させると FOS は消化されずに盲腸に到達し腸内細菌により発酵をうける。その際に短鎖脂肪酸が生産されるため通常は盲腸内容物の pH が低下する。この pH 低下は、C 群と CF 群間には認められたが、D 群と DF 群間には認められなかった。FOS 摂取により大根葉中の鉄の生体利用性が改善されなかった理由として、大根葉摂取による盲腸発酵の変化が示唆される。

【結論】鉄欠乏性貧血ラットの貧血改善を指標とし、大根葉中の鉄の生体利用性を評価したところ極めて低いことが明らかとなった。また、FOS 摂取によっても大根葉中の鉄の生体利用性は改善されなかった。

【参考文献】Ohta, A. et al., J. Nutr. 128, 485-490 (1998)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-064	氏　名	河村　裕紀
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	動物モデルにおけるシークヮーサー摂取の影響		

【目的】クエン酸またはレモン果汁の摂取で運動後の血中乳酸濃度が低下することが報告されている。本研究では、間欠的高強度運動負荷ラットにおけるクエン酸含有食品であるシークヮーサー（*citrus depressa*）果汁（JA 沖縄）の単回強制投与が運動後の血中乳酸低下作用および代謝性アシドーシス改善作用に及ぼす影響を検討する。

【方法】6～7 週齢の雄性 SD 系ラット 32 匹を用い、運動群（Ex）16 匹と安静群（Sed）16 匹に割付けた。それぞれのラットは更に 0.9% NaCl 投与群（ｎ＝8；CT)、シークヮーサー果汁投与群（ｎ＝8；CD）に割付けた。試験実施日には胃ゾンデを用いて各被検液 2ml を強制投与し、運動群は投与 30 分後に強制遊泳運動を負荷した。運動負荷は体重の 18% 相当の重りを胴部に巻きつけ、10 秒間の休息を挟み、20 秒間の強制遊泳を 8 回繰り返した。ラットは強制投与前、投与 30 分後（運動負荷前)、35 分後（運動負荷 5 分後)、60 分後（運動負荷 30 分後）の 4 回、尾静脈より行い採血を行い、血液ガス分析装置（i-STAT）を用い、血液 pH、二酸化炭素分圧（*p*CO2）および乳酸濃度を測定し、BE および重炭酸イオン濃度は計算式より算出した。また投与 90 分後には全てのラットを全血採血により屠殺し、肝臓、腎臓、ヒフク筋、ヒラメ筋を摘出した。データは反復三元配置分散分析で解析後、各採血時における群間の比較は Tukey 法を用いた。

【結果】反復三元配置分散分析の結果、全ての血液指標で運動の主効果に有意差が確認され、交互作用は時間と運動の主効果においてのみ観察された。重炭酸イオン濃度においては被検物の主効果に有意差が確認された（p=0.043)。投与 35 分後の血液重炭酸イオン濃度では Ex 群が Sed 群に比して有意な低値を示し、Ex-CD 群は Ex-CT 群に比して有意な高値を示した。投与 60 分後の Ex-CD 群の血液 pH および BE は、Ex-CT 群に比し高値を示したが統計的有意差は確認されなかった。

【考察】本研究では、シークヮーサー摂取により血液重炭酸イオン濃度が上昇したものの、間欠的高強度運動時の血液乳酸濃度の低下作用および代謝性アシドーシス緩和作用は確認されなかった。投与量および負荷運動量などを今後検討する必要がある。また本研究では分析できなかったが、採取した肝臓や骨格筋における糖代謝関連酵素群の活性についても検討するべきであると考える。具体的にはクエン酸が阻害作用を有する PFK や乳酸産生に関わる LDH や PDC などの酵素活性測定を計画し、また血液中乳酸濃度に影響する肝臓および骨格筋における乳酸トランスポーターである MCT1、MCT4 の発現量を検討することを計画している。

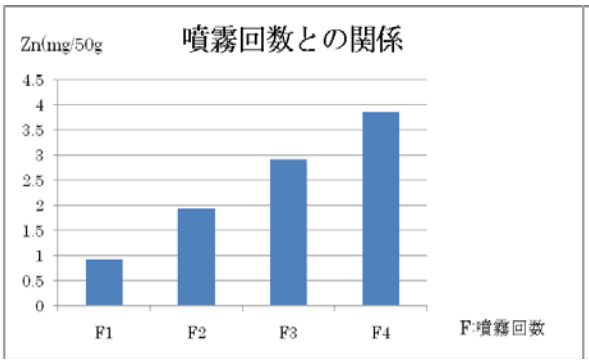
卒業論文（2011 年度）

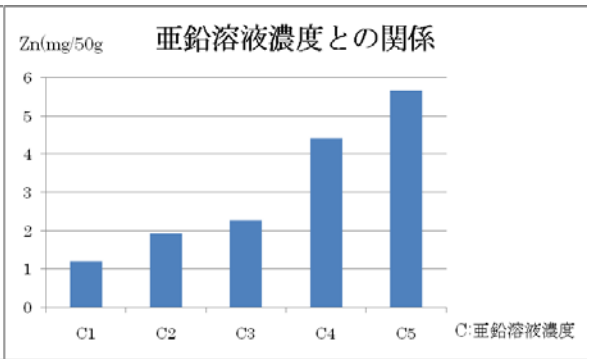
学籍番号	PC2006－091	氏　名	宮内　成章
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	カイワレダイコンの亜鉛強化法開発		

【目的】亜鉛は必須微量元素の一つであり、正常な味覚、創傷の治癒、精子の形成に必要な他、肝臓内のアルコールの解毒などにも関与している。そのため亜鉛が欠乏すると味覚障害、創傷治癒の遅延、男性不妊、低アルコール耐性などの様々な症状を発症する。近年における日本人の食生活の変化は亜鉛の摂取不足をもたらし、さらに亜鉛の吸収を妨げる食品添加物の摂取も増加しているなどにより、亜鉛が潜在的に欠乏している人が少なくない。牡蠣は、亜鉛を豊富に含む数少ない食品であるが、日常的に摂取するものではない。そこで、牡蠣に匹敵する亜鉛を日常的に摂取できる食品の開発を考えた。対象食品としては、以前に水耕栽培で一定の鉄分を強化することに成功しその生体利用性も良好であったカイワレダイコンを選んだ。しかし、予備的な検討を行ったところ、鉄強化水耕栽培と同じ方法を亜鉛に適用すると根の成長阻害を起こしカイワレダイコンが発育しないことがわかった。そこで今回はカイワレダイコンに対する新たな亜鉛強化法を検討した。

【方法】通常の水道水で育てたカイワレダイコンを対照とした。亜鉛を溶解させた水道水をカイワレダイコンに噴霧する回数(栽培中の時期)と濃度の 2 つの要因について種々の組合せで検討した。栽培終了後収穫し、十分に洗浄した後、一定量のカイワレダイコンを灰化し ICP 発光分光分析法により亜鉛含有量を測定した。また別の実験で、洗浄時には洗い流されないが噴霧した亜鉛が葉や茎に単に付着したものではないことを検証するため、ピペットを用いて亜鉛溶液を根のみに散水する実験も行った。

【結果】亜鉛噴霧カイワレダイコンの亜鉛を測定した結果、亜鉛含有量が増加することが解った。カイワレダイコン中の亜鉛含有量は、噴霧する濃度の上昇および回数の増加に比例し直線的に増加した。ただし、亜鉛濃度が著しく高値となるような条件下では、根や葉にダメージが生じた。また亜鉛溶液を根に直接投与した場合にも、噴霧時と同程度以上の亜鉛含有量の上昇が確認され、亜鉛の増加は根からの吸収によることが証明された。





【考察】根や葉にダメージを与えず亜鉛の含有量が最高となる栽培方法を絞り込むことで、亜鉛含有量をカイワレダイコン 100g 当たり 30mg まで高めることができた。

【結論】今回の検討により、亜鉛含有量が市販のサプリメントに匹敵するカイワレダイコを開発することに成功した。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-098	氏　名	東　静香
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	ビタミン D 強化カイワレダイコンの開発		

【目的】近年、野菜の健康イメージから、食生活の菜食志向が高まっている。しかし、菜食主義者のような極端な食生活では、ビタミン B_{12} 欠乏に陥ることもある。通常のカイワレダイコン（カイワレ）にはビタミン B_{12} は含まれていないが、既にビタミン B_{12} 強化カイワレが開発されている。このカイワレは、ビタミン D 以外の全てのビタミンを含有している。仮にこのカイワレにビタミン D を含有させることが出来れば、全種類のビタミンを含有したマルチビタミンカイワレとすることができる。ビタミン B_{12} は水溶性であるため、水耕栽培溶液に添加することでカイワレに強化することが比較的容易に出来る。しかし、ビタミン D は脂溶性であり水には溶解しないため、水耕栽培溶液への添加により、含有量を増加させることはできない。今回、ビタミン D の強化法の開発を試みた。

【方法】カイワレ種子 15g をネットに入れ 3 時間水に浸漬した後に 4 等分し、当研究室で独自に開発した家庭用栽培キット(4 個)を用いて栽培を行った。栽培期間は気温 22 度を保てる室内で約 1 週間栽培した。栽培初期(3～4 日)は直射日光を避け暗所に静置した後、栽培中期以降(3～4 日)は日光に当て緑化を行った。高さが 10cm 程度に成長したところで可食部(スポンジ上部 4cm 以上をはさみで切断後、全長が 1cm 以上の部分)を収穫した。丁寧に種皮を取り除いた後に、蒸留水で十分洗浄した。カイワレ中ビタミン D 測定はカイワレ 15g をホモジナイズ後、1wt%ピロガロール-EtOH 溶液 30mL、60wt%KOH 溶液 15mL を加え、70 度の温浴に 1 時間加温し鹸化した後に冷却した。1wt%NaCl 57mL、酢酸エチル-n-ヘキサン(1:9v/v)45mL を加えて 2 度抽出操作を行った。抽出層を、エバポレーターを用いて減圧濃縮乾固させた後、アセトニトリル-MtOH(9:1v/v)3mL に溶かした。この溶液を遠心分離後フィルターに濾過し測定用サンプルとした。測定は、HPLC 法(Column ： YMC-Pack ODS-A; 4.6mmi.d.x150mm , Mobile phase：CH3CN / CH3OH = 80 / 20Flow rate：1.0mL / min, Temperature：35℃, Detection：UV254nm)により行った。ビタミン D の溶媒、溶媒処理過程、種皮加工の有無について検討した。用いた溶媒は Acetone、EtOH、溶媒処理過程は播種前後、種皮加工は種子に物理的処理を施すことにより行った。

【結果・考察】これまでの検討では、HPLC 法分析でビタミン D のピークが検出されたのは、物理的処理を施し、播種前に特定のビタミン D 溶媒を用いた場合のみであった。

【考察】種皮の物理的加工の有無で比較すると、種皮の物理的構造が溶媒の浸透を防御していることが示唆される。特定の条件下で栽培したカイワレにおいて HPLC 法分析でビタミン D のピークが検出された。このピーク面積から、栽培したカイワレ 50g(1 個)中にビタミン D 28.8 μ g のが含まれている可能性が示唆された。

【結論】物理的処理を施した種子を播種前に特定の溶媒を用いビタミン D を負荷すると、HPLC 法分析でビタミン D のピークが検出された。カイワレ 50g(1pack)中に 28.8 μ g のビタミン D が強化できた可能性が示唆された。今後、再実験により確認を行うとともに、更に効率的な方法の開発を試みる予定である。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-106	氏　名	大風　りさ
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	特定保健用食品（トクホ）の適正利用における栄養情報担当者の使命と課題に関するアンケート調査		

【目的】近年、生活習慣病の予防を目的としたトクホの市場が大きく拡大している。しかし、生活習慣病の増加は衰えることなく、これに起因する医療費も増加の一途をたどっている。このことはトクホが本来の目的を果たせていないことを示唆している。ＮＲを中心としたトクホに関するアドバイザリースタッフが存在するものの、その活動がトクホ適正利用につながっていないことも一因と考えられる。そこで今回トクホの適正利用を推進するためのＮＲの課題を知ることを目的としWeb アンケート調査を行った。

【方法】アンケート内容は、ＮＲ制度について 13 項目、特定保健用食品について 7 項目、事業仕分けについて 7 項目の大きく３つに分け、計２７項目を作成した。Ｗｅｂシステムのレンタルアンケートフォーム「Xform」を利用し、作成した項目をもとにアンケート画面の構築を行った。回答期間は 2010 年 7 月 23 日から 2010 年 8 月 9 日までとした。アンケート対象者は、ＮＲ養成講座及びＪＩＵ卒業生とＮＲ協会関係者に、メールにて案内を出しアンケートフォームへと誘導した。

【結果】メールを送信したおよそ５分の 1 程度の人から回答が得られた。回答者は薬剤師、栄養士、管理栄養士が 50%、その他職業が 50%であった。「ＮＲが国民の健康維持・増進のために活躍するには何が出来るか」について選択肢４つを複数回答にした結果、「適切な情報提供」72.3%、「お客さんが相談しやすい環境作り」57.4%の 2 項目が半数以上を占めた。一方、現状で十分な情報提供が行われているかという設問では「行われている」28.7%、「行われていない」62.7%、「どちらでもない」8.5%であった。ＮＲが世間一般に知られているかについては、94.7%の人が「世間一般には知られていない」と回答した。実際に「情報提供が十分に行われるために必要なこと」については、回答人数 94 人中 68 人が自由回答中一番多くあげられたのが、「知名度の向上」で 45.6%、次いで「情報提供の機会」で 19.1%あげられた。「知名度向上のために有効であると思うものとして何が必要か」という設問に対し選択肢 6 つを複数回答可にした結果、過半数を超えたものとして「雑誌広告」60.6%、「新聞広告」57.4%、「店舗用ポスター」51.1%があげられた。

【考察】今回の調査は、アンケート回答者の半数がアドバイザリースタッフを仕事としていない人である点に問題があった。しかし、多くの人が知名度が低いために消費者から相談される機会がないことが、トクホの適正利用が行われていない現状を生んでいると考えていることが解った。知名度向上に有効な媒体に雑誌、新聞の広告やポスターが有効という意見が多くあったが既に実施済みのものもあり、今後はより有効な知名度向上のための施策の模索が必要であると考える。

【結論】トクホの適正利用推進にＮＲが貢献するためには、まず第一にＮＲの知名度を何らかの方法で向上させることが最大の課題であり、そのことが実現できれば情報提供の機会をより多く確保することができ、トクホの適正利用を通じて国民医療費の増加抑制が可能であると NR 有資格者の方々が考えていることを明らかにできた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-129	氏　名	中川　雄介
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	マグネシウム欠乏性テタニー易発モデルラットの開発		

【目的】マグネシウム(Mg)欠乏症状の一つにテタニーの発症がある。牛や羊において Mg 含有量が少ない牧草で飼育されたことにより発症するグラステタニーという病態も報告されている。ラットを Mg 無添加飼料により飼育すると外部刺激などのストレスに対して易刺激性となる。例えば Mg 欠乏状態にあるラットに高周波(10kHz)の音刺激を負荷することでテタニーを発症することが予備実験から確認されている。しかし、予備試験の段階では Mg 欠乏性テタニーの発症率は 5 割以下と低く、安定した発症が得られていない。また予備試験におけるテタニー発症に関して周波数の違いについても検討されていない。そこで本試験ではラットにおける Mg 欠乏性テタニー発症メカニズムの解明に着手するために、高確率で Mg 欠乏性テタニーを発症させる飼育条件の設定や周波数の違いが及ぼす影響について検討を行った。

【方法】5 週齢の Jcl:SD 系雄性ラット 20 個体を Mg 無添加飼料で 15 日間飼育し Mg 欠乏ラットを作製した。また、飲料水は蒸留水を用い Mg の摂取を可能な限り制限した。尾採血による血中 Mg 濃度の測定を飼育開始初日と実験日当日に行い、ラットが Mg 欠乏状態にあることを確認した。まず、ラットを 1 個体ずつ飼育室から隔離された実験室に移動させた。次に、ラットを呼気分析装置オキシマックス用チャンバーに入れ、直ちにノート PC に接続したチャンバー内の 2.5W スピーカー2 個から、20 個体中 10 個体については 10kHz から 20kHz の音源ファイルを各周波数帯で 90 秒間ずつ合計 180 秒間連続再生(L 法)し、高周波音刺激に暴露した。別の 10 個体については高周波音刺激の方法を 20kHz から 10kHz まで 2000Hz ずつ下げていく方法に変更し、各周波数帯で 30 秒間ずつ合計 180 秒間負荷(H 法)を行い、テタニー発症の有無と発症までの時間を観察した。

【結果・考察】L 法における高周波音刺激を行ったラット群では 10 個体中 9 個体がテタニーを発症した。高周波音刺激を行ってからテタニー発症までの時間は 10.3±2.5 秒(mean±SE)。H 法における高周波音刺激を行ったラット群では 10 個体中 10 個体がテタニーを発症し、発現までの時間は 42.3±10.6 秒(mean±SE)であった。テタニー発症の有無と発症までの時間は共に高周波音刺激方法である L 法・H 法の間で有意差はなかった。

【考察】全体として 20 個体中 19 個体にテタニーを発症させることが可能となり、Mg 欠乏飼料飼育期間を延長することによる Mg 欠乏状態の維持により、高率で Mg 欠乏性テタニーを発症させることが可能となった。10kHz と 20kHz という周波数帯で有れば、その変化のさせ方は、Mg 欠乏性テタニーの発症率には影響しないことが明らかとなった。また高周波音刺激はラットにおいて過剰な情動応答を惹起させテタニーを発症させている可能性があり、高周波音刺激下で Mg 欠乏状態ラットと正常ラットでの生理的変化を比較することで Mg 欠乏性テタニー発症メカニズムの解明に繋がるものと考えられる。さらにこの実験系は、易刺激性を緩和する成分等の評価に応用できる可能性もある。

【結論】Mg 無添加飼料により 15 日間以上ラットを飼育し 10kHz あるいは 20kHz の音刺激を負荷ことにより高い確率(ほぼ全例の個体)でテタニーを発症させることが可能となった。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-148	氏　名	池田　泰朗
所属研究室	臨床栄養学研究室		
研究テーマ	ラットを用いた、亜鉛強化スプラウトの亜鉛生体利用性評価		

研究概要

【目的】亜鉛(Zn)は生体に必須の微量元素であり、種々の生化学的過程に関与するきわめて重要な元素の一つである。臨床栄養学研究室では、今までスプラウト(植物の新芽の総称。ブロッコリーやカイワレなど)について研究を行ってきた経験より、カイワレダイコン中の Zn 含有量を増大させた Zn 強化カイワレを開発した。しかし、Zn は食物繊維やフィチン酸などが吸着することにより吸収が阻害される。また、カルシウムや銅なども Zn の吸収と拮抗することが知られている。そこで、研究室で作成した Zn 強化カイワレ中の Zn が実際に生体に吸収され、利用されているかどうかを評価する目的で本実験を実施した。

【方法】試験飼料は、CZ 群は AIN-93G の組成に従い、C 群を Zn 欠乏飼料とし、K 群は Zn 欠乏飼料に市販のカイワレを、KZ 群は Zn 欠乏飼料に Zn 強化カイワレをそれぞれ添加し作成した。カイワレは凍結乾燥後粉砕し、飼料中のセルロースの一部と置き換えて添加した。実験動物として、4 週齢の雄の SD 系ラット 30 匹を購入して使用した。飼料により CZ,C,K,KZ の 4 群(1 群=7～8 匹)に分け、1 匹ずつ代謝ケージに入れ 14 日間(d0 から d14)飼育を行った。飼育終了後、採血を行い、屠殺後、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、睾丸、副睾丸脂肪、心臓、胸腺、大腿骨を摘出し重量を測定した。大腿骨は、軟組織を取り除いたのち乾燥重量を求めた。また、d7 から d11 までの全ての糞、摂食量を回収、記録し出納試験を行った。血清 Zn 濃度は測定キット(Zn-テストワコー)用い、飼料及び糞、大腿骨中のミネラル(Zn,Ca,Mg)は灰化後、ICP 発光分析法を用いて測定を行った。統計処理には Tukey HSD 法を用いて群間の有意差の検定を行った。

【結果】今回の実験では、脱毛や皮膚炎などの Zn 欠乏症状は発症せず、飼料の違いによる 4 群間での体重増加量及び摂食量には有意な差は認められなかった。CZ 群と KZ 群については、各種組織重量、血清 Zn 濃度及び大腿骨中 Zn 量にも有意な差は認められなかった。出納試験の結果では、Zn 及び Mg の吸収量で KZ 群が CZ 群よりも有意に高値を示し、Ca の吸収量では CZ 群と KZ 群は同等となった。しかし、吸収率では Zn,Mg 及び Ca の 3 種とも CZ 群と KZ 群に有意な差はみられなかった。また、Zn 吸収量と大腿骨中 Zn 量では高い相関(Peason の相関係数 $r=0.83, p<0.01$)がみられた。

【考察】本実験の結果より、Zn 強化カイワレ中の Zn は、AIN-93G に含まれている炭酸 Zn と同等かそれ以上に吸収性が優れ、生体利用性も同等であると考えられる。また、大腿骨中の Zn は体内 Zn の充足状況を反映することが知られており、本実験でもそれを確認できた。このことからも、Zn 強化カイワレ中の Zn は阻害されることなく生体に利用されることが考えられる。

【結論】今回開発を行った Zn 強化カイワレ中の Zn は生体に吸収され利用されることが示唆された。

【参考文献】柏原典雄ら：日本本栄養・食糧学会誌、35、281（1982）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-029	氏　名	平　裕史
所属研究室	生薬学研究室		
研究テーマ	南太平洋諸島の民間薬 *Morinda citrifolia* L.葉部の化学・薬理学的研究（１） - 抽出エキスの分画と抗炎症活性評価並びに含有トリテルペンの化学構造 -		

【目的】　*Morinda citrifolia* L.は南太平洋諸島や東南アジアにおいて、種々の部位を薬用に用いるが、特に葉部が最も一般的に用いられ、古くから皮膚の炎症や外傷、頭痛、歯痛、口内炎等に利用されてきた。そこで、民間薬としての用法より抗炎症作用を推定し、炎症メディエーターである prostaglandin (PG) E_2 及び histamine (Hist) に対する抑制活性を指標として、本葉部の抗炎症作用、並びに活性に寄与する成分を明らかにしようと試みた。

【方法・結果・考察】　ハートレイ系モルモット摘出回腸を用いたマグヌス法により、PGE_2 及び Hist 誘導収縮に対する抑制活性を抗炎症作用として評価した。トンガ王国で採取され、植物種が同定された *M. citrifolia* の乾燥葉 (specimen No. SKP010002T; McL2 と仮称、約 300 g) を粉末にし、MeOH で抽出してエキス (31.2 g) を得た。本エキスを少量の MeOH に溶解させ、析出した不溶物を取り除いた後に、ダイヤイオン HP20 カラムクロマトグラフィー (CC) にて粗分画した。活性評価により、fr.2C (0.93 g) にのみ 2×10^{-4} g/mL の濃度で強い PGE_2 及び Hist 抑制活性が確認され、この画分に活性が集約していることが分かった。そこで、fr.2C を更に Sephadex LH-20 CC ($CHCl_3$:MeOH=1:3) で分画し fr.4A～4D を得た。1×10^{-4} g/mL の濃度で fr.4A、fr.4B に PGE_2 抑制活性が認められ、Hist 抑制活性は fr.4A、fr.4B の他に fr.4C にも認められた。fr.4B の ODS-TLC では、リンモリブデン酸噴霧-加熱により、二つの主スポットを確認したため、これらに相当する化合物を compound 1 及び compound 2 と仮称し、更に分画・精製を試みた。fr.4B (356 mg) を ODS-flash CC (H_2O:MeOH=1:5) にて分画し、ODS-TLC でほぼ単一スポット (compound 1) を与える fr.8H (27 mg) を得た。しかし、fr.8H の NMR スペクトルにより、compound 1 の他に夾雑物の存在が認められた。主シグナルの解析からトリテルペン類のウルサン系化合物と考えられたため、*M. citrifolia* の文献検索を行い、トリテルペン類として ursolic acid、並びにその関連化合物の報告を見出した。そこで、fr.8H の主成分 (compound 1) と標品の ursolic acid を TLC で比較したところ、Rf 値が一致した。標品の ursolic acid を用いて ^{1}H-及び ^{13}C-NMR におけるシグナルの帰属を行い、また活性評価を行ったが、PGE_2 及び Hist ともに抑制活性は確認されなかった。今後 compound 1 を精製し、同定を行うつもりである。なお、ursolic acid の抗炎症活性に関連して COX 阻害活性が報告されている。fr.8D (25 mg) は silica gel flash CC で分画し、compound 2 (9 mg) を精製した。compound 2 は ^{1}H-、^{13}C-NMR 及び 2D-NMR の解析結果、並びに関連文献より pomolic acid と同定した。pomolic acid は *M. citrifolia* 根からの単離報告はあるが、葉部からの単離は始めてである。

【結論】　*M. citrifolia* 葉部エキスの粗画分に、PGE_2 並びに Hist に対する抑制活性を見出した。そこで、活性を指標とした分画を行い、活性画分に ursolic acid の存在を認めると共に、pomolic acid を本葉部より始めて単離した。ursolic acid の活性評価により、PGE_2 及び Hist 抑制活性は認められなかった。pomolic acid に関しては活性評価に到らなかったため、今後、pomolic acid の活性評価を行うと共に、活性画分 fr.4B 周辺の更なる分画・精製により活性成分を明らかにし、本葉部の抗炎症作用に対する科学的な知見を提供したい。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-030	氏　名	武田　崇二
所属研究室	生薬学研究室		
研究テーマ	南太平洋諸島の民間薬 *Morinda citorifolia* L. 未熟成ジュースの化学・薬理学的研究（１）−粗分画における抗炎症活性評価と rutin の同定−		

【目的】 *M.citorifolia* の果実を熟成させて作る noni ジュースは特に南太平洋諸島において腹痛、頭痛、心疾患、糖尿病など種々の症状改善に用いられているが、近年多くの国々で健康食品として流通されるようになった。本研究室の田中等は noni ジュースの用法より抗炎症作用を推定し、prostaglandin（PG）などの炎症メディエーターに対する抑制作用を見出すと共に、活性に寄与する化合物を明らかにした[1)]。noni ジュースは一般に果実を熟成させて作るが、特異な臭いを生じるため、熟成させない場合の薬効に興味が持たれた。そこで、本研究では、果実を熟成させていないトンガ産ジュース（specimen No. SKP010003T; MJ-1 と仮称、12 L）を研究素材として、PG 活性等を評価検討した。

【方法・結果・考察】抗炎症活性の評価として、モルモット摘出回腸を用いたマグヌス法により、炎症メディエーターである PGE_2 及び histamine（Hist）による誘導収縮に対する抑制活性を指標とした。分画の際は、small scale での検討をもとに large scale にて分画を行った。MJ-1 には K^+ が多く含まれると推定されたため、MJ-1 12 L をろ過した後に K^+ を除くため HP-20 カラムクロマトグラフィー（CC）で粗分画を行った。K^+ 非含有画分 fr.3B の抑制活性評価を行ったところ、1×10^{-3} g/mL で PGE_2 並びに Hist に対し抑制活性が認められた。そこで、活性本体を明らかにするために、これらの活性を指標として fr.3B の分画を行うこととした。fr.3B（140 g）を LH-20 CC（MeOH-H_2O 3/1）で分画し、活性を評価したところ抑制活性は分散し、fr.7D〜7F（1×10^{-4} g/mL）に強い活性が認められた。fr.7F（290 mg）には TLC 上 major spot が観察されたため、まず、この spot に相当する化合物の分離・精製を試みた。fr.7F を ODS-flash CC（MeOH-H_2O 1/1）で分画し、得られた fr.8D（110 mg）は LH-20（MeOH）によりさらに精製を行い、fr.9E（83.2 mg）を得た。fr.9E は、ほぼ精製されていたが、MeOH-H_2O から再結晶を行い、淡黄色、顆粒状晶の 9E-C1（67.1 mg）を得た。9E-C1 は 1D-並びに 2D-NMR 等より flavonoid 配糖体と考えられ、*M.citriforia* からすでに単離報告されている rutin と推定した。そこで、標品と各種スペクトルを直接比較し、同定した。本化合物の活性評価を行ったところ、5×10^{-3} g/mL において PGE_2、Hist に対して抑制活性を示さなかった。しかし、サンプルの可溶化、均一化が十分でなかった可能性も考えられることから、サンプル調整の検討が必要と思われる。

【考察・結論】*M.citorifolia* の果実を熟成させずに作られたジュース MJ-1 は、粗分画において PGE_2 並びに Hist に対し強い抑制活性を示し、抗炎症作用を有していると考えられた。活性に寄与する成分を明らかにするため、活性を指標とした分画を行い、活性画分の１つより rutin を同定した。しかし、rutin には抑制活性は認められなかったため、今後、他の活性画分を検討し抗炎症活性を示す化合物を明らかとすることが必要である。

【参考文献】1） E.Okuyama,Y.Tanaka,D.Watanabe. et al., Prostaglandin-inhibitory components of ripe fruit juice of *Morinda citrifolia*. Pacifichem 2010, Honolulu, Hawaii.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-066	氏　名	京田　麗奈
所属研究室	生薬学研究室		
研究テーマ	漢方薬データベースの検討と構築（1） －テンプレートの作成と漢方薬データ前半部入力－		

【目的】近年、薬局や病院など医療の現場においても化学合成医薬品とともに漢方薬も数多く取り扱われるようになり、医療従事者や薬学部生も漢方薬や生薬についての必要な情報を迅速に入手し、知識を深めることが必要となっていると思われる。そこで、薬学生のみでなく医療現場においても漢方薬に関する適切な情報を円滑に得られるようなデータベースが必要とされるのではないかと考えた。生薬学研究室では、薬学生や医療従事者が利用でき、将来的にも情報を追加修正することが可能であるような「漢方薬データベース」の作成を目的に 2007 年度から検討が開始され、基本ベースとして@wiki を利用した検索システムの構築が図られてきた。そこで本年度の研究では既存のシステムを基に、漢方薬データベースにおける漢方薬並びに生薬ライブラリー作成に必要なテンプレートの記載項目の検討を行い、テンプレートの作成と漢方薬データライブラリーの構築を行った。

【方法・結果】本データベースにおける漢方薬ライブラリーの情報量の設定としては、漢方薬において汎用されているツムラの医療用漢方エキス製剤を参考に漢方薬 128 処方を、生薬ライブラリーにおいては漢方配合生薬である生薬 319 種類の情報を掲載することに決定した。そして、リンク機能を用いて漢方薬とその配合生薬のページをそれぞれリンクさせることで漢方薬と生薬データが連携し、データベース全体としての有用性を向上させることにした。テンプレート作成の際は他の類似データベースとの差別化も考慮して項目を作成した。漢方データライブラリーのテンプレートにおいては、製薬会社ごとの「構成生薬配合比率表」を掲載した他、漢方・生薬ともにテンプレートの項目について幅広い情報が一度に入手できるだけでなく西洋学的見地、漢方学的見地の両方からの情報が同時に得られるように記載項目を工夫した。データ入力の際には、考え方に偏りがなく信頼性を考慮していくつかの書籍や添付文書等公式の情報を参考とした。なお本研究は黒川陽子氏との共同研究で行い、テンプレート記載項目を協議して検討し、両テンプレートを作成した。漢方薬データの入力では黒川陽子氏がツムラ製品番号順での後半部を、自分が前半部を担当した。

【考察・結論】これまで本データベースは基本システムの構築やテンプレートの検討が行われていたが実際に使用できるまでには至っていなかった。そこで今回、漢方薬データベースの実際の活用を目指して、テンプレートの作成と漢方薬データの入力を行い、使用可能な状態とすることができた。本データベースは将来的に情報を追加修正することができるシステムであるため、今後リファインを行い改善点や追加点等を検討し改良を行うことができる。また、漢方医学理論や漢方専門用語集などの専門用語の解説についての情報を新たなデータライブラリーを作成して導入することや、他に効能効果別、症状別などの検索機能を加えること等より多くのコンテンツの充実を図ることによって情報を充実させて、医療現場においても利便性のあるデータベースの構築が可能となると思われる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-161	氏　名	黒川　陽子
所属研究室	生薬学研究室		
研究テーマ	漢方薬データベースの検討と構築（2） ―テンプレートの作成と漢方薬データ後半部入力―		

【目的】近年、漢方治療について人々の関心が高まっているが必要な情報を得ることは必ずしも容易ではない。そこで薬学生や医療従事者が効果的、効率的に漢方薬を検索でき、将来に渡り情報の追加・修正可能な「漢方薬データベース」を作成しようと、平成 19 年度から本研究室で検討が開始され、これまでに基本システムの構築まで完了した。本卒業研究においては、実際の利用を鑑みたデータ入力のためのテンプレート作成と漢方薬データライブラリーの作成を試みた。

【方法・結果】データベース中の漢方薬データライブラリー構築のために、まずテンプレート作成を行った。また、漢方薬データから配合生薬へ関連づけて検索できるよう生薬データライブラリーの構築も考慮し、生薬テンプレートも合わせて検討をした。テンプレートの特徴として、西洋医学的見地からの分類、漢方医学的見地からの分類に完全に分けることに拘らず作成した。漢方薬テンプレートの場合、西洋医学的な「適応症」と漢方医学的な「適応症」を合わせて「適応症状」にして病名や症状を記載し、「効能・効果」を「効能効果等」とし、効き目、働き（方意の内容）、六病位、八綱分類を記載することにした。また、「その他」の項目でも西洋医学的及び漢方医学的見地に二分せず、漢方製剤の色、におい、味等を記載することとした。生薬テンプレートでは神農本草経における「上薬」、「中薬」、「下薬」の分類、「性味」、「薬味」、「薬性」の項目を一まとめにした「性味など」の項目を作り、更に生薬・植物の写真の掲載、「成分」の項目に化合物群と英語名を入れることとした。その後、漢方薬テンプレートを基にいくつかの参考書籍を選択し, まとめて漢方薬データを入力し、漢方薬データライブラリーを作成した。なお、本研究は京田麗奈氏との共同研究として行った。入力する漢方薬としてはツムラの医療用漢方エキス製剤 128 品目の内、整理番号順に並べた後半部を担当し、前半部は京田麗奈氏が担当した。

【結論】これまで本データベースは基本システムの構築やテンプレートの検討が行われていたが本研究において、実際の利用を目指しテンプレートの作成と漢方薬データの入力を行った。テンプレート作成においては漢方薬・生薬の両データライブラリーのためのテンプレートを作成し、情報を入力する際に端的で入力しやすく、データライブリーから情報を入手する際も分かりやすいテンプレートとなったと思われる。漢方薬データライブラリーの作成では適切と思われる参考書籍からまとめたデータを入力したことで、より正確で必要な情報を検索できるようになったが、十分なリファインを行うまでには至らなかったため今後検討する必要がある。生薬ライブラリーに関してはテンプレート作成まで行ったが、時間的にデータ入力を行うことが出来なかった。今後、効能効果別・症状別などの探索機能の充実や専門用語ライブラリーなどのライブラリーが作成されれば、より汎用性のあるデータベースになると期待される。

【参考文献】「改訂　一般用漢方処方の手引き」　武田正一郎　じほう ;「腹証図解　漢方常用処方解説（新訂 15 版）」　高山宏世　三考塾叢刊、その他.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-126	氏　名	伊達裕之
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	シタグリプチン(DPP-4 阻害剤)の処方動向と副作用の発現状況		

【目的】新しい作用の糖尿病薬である DPP-4 阻害剤のシタグリプチンは、低血糖や体重増加などの副作用が少ない新薬として期待されている。しかし、死亡に至る重篤な低血糖の副作用が報告されており、今回大学の近隣地区である山武地区でのシタグリプチンの処方状況ならびに低血糖を含む副作用の発現状況について、山武郡市薬剤師会の薬局を対象としたアンケート調査を実施した。

【方法】山武郡市薬剤師会会員 65 薬局に FAX によるアンケートを依頼した。アンケート調査内容として、シタグリプチリンの処方に関しては受付状況、処方せん枚数、患者の年齢、併用薬の有無、有効例と副作用発現の有無とした。副作用に関しては、発現年齢、併用薬、副作用内容、発現までの時間や発現時の対応とし、FAX による回収を行った。

【結果】アンケートは 65 薬局全てから回収、シタグリプチンは 28 薬局(43.0%)で合計 150 枚の処方せんを受け付けており、処方せん枚数は大網地区が最も多く、次いで東金地区、成東地区の順であったが、患者数が最も多かったのは東金地区であった。また年齢別に見た処方患者は高齢になるほど処方が多くなっていた。血糖値や HbA1c より、顕著な有効例は 52 例(34.7%)であった。シタグリプチン単独の処方もあるが、併用薬としては SU 剤、ビグアナイド系薬剤がほぼ同数であり、ついでピオグリタゾンであった。副作用に関しては、7 件の報告があり、最も多かったのは低血糖(4 件)であり、65 歳以上の高齢者で多い傾向があり、併用薬無しでも 1 件報告されたが、SU 剤との併用で 5 件(8.6%)と最も多く、副作用発現期間は 2 週から 1 カ月の間が 3 件であり、1 例は投与を中止していた。

【考察】シタグリプチリンは新しい作用機序の薬剤として注目を集めており、当地区においても発売後半年で 4 割以上の薬局が患者を受け付けている。当初低血糖が少ないとされていたが、本調査においても重篤ではないものの、4 例の低血糖を経験しており、SU 剤との併用時が最も多かった。SU 剤とは作用機序の違いから、直接的な相互作用は考えにくいが、2 種の薬剤が膵β細胞に作用することを考えると何らかの相互作用がある可能性がある。また 65 歳未満の患者数と、65 歳以上の患者数がほぼ同数にもかかわらず、65 歳以上の患者に副作用発現が多かった。低血糖が少ないと言われている DPP-4 阻害剤であるが、特に高齢者や SU 剤との併用では、薬剤師として薬歴より処方変更の有無、低血糖症状発現の有無、また患者の低血糖への対応などを確認し、必要に応じて疑義照会や患者指導を実施する必要がある。また、新薬であり、臨床結果が乏しいことから、医師のみならず薬剤師も含めた臨床研究によって今後適正な使用につなげていきたい。

【結論】既存の糖尿病薬に比較して，低血糖や体重増加の副作用が少ないと言われている DPP-4 阻害剤であるが、他の薬剤、特に SU 剤の組み合わせで低血糖が起きやすくなるため、薬歴での処方変更や併用薬の確認と適切な患者指導が重要である。

【参考文献】濱口良彦、他、日本病院薬剤師会雑誌、47、53-57 (2011)、岩倉俊夫、他、糖尿病、53、505-508 (2010).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-162	氏　名	小池猶土
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	注射筒で効率的に一定量を採取する手技の確立		

【目的】実務実習を経験し、薬剤師業務の多さから、より効率的な操作の必要性を痛感した。薬剤師業務は多岐にわたるが、今回は注射筒で一定の液量を採取する際に、より正確で効率的な手技を確立する検討を行った。

【方法】１．材料：注射筒：5mL、10mL（テルモ）・注射針：18G（テルモ）・生理食塩液：100mL ソフトバッグ（テルモ）。

２．調査対象：本学薬学部 4 年生 10 名、5 年生（病院実務実習終了生）10 名。

３．操作時間ならびに採取液量の測定：注射筒に注射針を接続後、針のキャップを外し、天秤で 0 合わせを行った。その後以下の操作で生理食塩液バッグより一定量（5mL シリンジ：2mL、10mL シリンジ：5mL）を採取、再度シリンジの重量を測定し、採取液の重量を測定、生理食塩液の比重（1.006）より採取液量を求めた。調整時間は、天秤より注射筒を取り上げ、生理食塩液を採取し、目的とする液量まで調整後、重量を測定するために再び注射筒を天秤に載せるまでとした。この操作はいずれのシリンジも 1 名につき 3 回実施し、その平均を求めた。

４．操作

従来法：注射筒に液を採取し、その後空気を抜いて、液量を合わせた。

JI　法：あらかじめ注射筒の空気を抜き、それから液量を合わせて液を採取した。

【結果】4 年生の検討結果では、5mL、10mL いずれのシリンジも採取液量ならびに採取時間で、従来法と JI 法の間に差は認められなかった。しかし、5 年生の結果では 5mL、10mL いずれのシリンジにおいても、従来法に比べて JI 法の方が、有意に液量が採取目標に近くなり、正確性が増すとともに、採取にかかる時間は有意にほぼ半分まで短縮した。

4 年生採取液量　5mL：2.10mL→2.10mL、10mL：5.06mL→5.03mL（従来法→JI 法）

5 年生採取液量　5mL：2.09mL→2.02mL、10mL：5.04mL→4.98mL（従来法→JI 法）

4 年生操作時間　5mL：39.4 秒→35.8 秒、 10mL：45.1 秒→42.2 秒（従来法→JI 法）

5 年生操作時間　5mL：28.8 秒→15.4 秒、 10mL：35.6 秒→18.0 秒（従来法→JI 法）

【考察】注射筒には元々空気が入っており、一定の液量を採取しようとすると、空気抜きが必要な上に、目標とする液量より多く取らなければならない。これに対して、あらかじめ空気を抜いてから液を採取する JI 法では、空気抜きが短時間で済むとともに、注射筒の目盛りに合わせて液を抜くので、正確性も増すと考えられる。4 年生では従来法と差が無かったが、5 年生では有意に時間が短縮するとともに、より正確な液量を採取できた。4 年生は大学での医療系実習で操作を行ったのみであり、5 年生は病院実務実習で注射の操作を経験してきている。操作の慣れは操作時間にも表れており、従来法の比較においても約 10 秒の差が認められたのも操作への習熟度の差が表れたものと考えられる。

【結論】JI 法は、注射調製の操作が比較的慣れた人には、注射筒で一定の液量を採取する時の正確性の向上ならびに操作時間の短縮につながる有用な操作方法と考えられる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-165	氏　名	佐伯茉耶
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	C 型慢性肝炎患者への薬剤師の関わり		

【目的】C 型慢性肝炎治療には、インターフェロンとリバビリンの併用療法が治療効果を上げているが、程度の差はあるもののほぼ 100%に副作用が発現している。また、C 型肝炎は完治することが困難で、治療が長期であり、しかも現在自己注射が認められていないため、頻回の通院が必要である、などの理由で効果があっても途中で脱落する危険性が高い。入院中の薬剤師の関わりは特に副作用の説明や対応法などから、生活上の質問まで幅広く対応しなければならない。今回実習中に C 型慢性肝炎の患者を受け持ち、患者の理解度を上げることに寄与したと考えられる症例を報告する。

【症例】47 歳、男性（身長 170.5cm、体重 65.4kg)、16 歳の時に大量輸血を行い、C 型肝炎ウイルスに感染したと考えられる。出血性胃潰瘍（40 歳)。喫煙歴：20 本 x 25 年。副作用歴：ペグイントロン＋レベトールで湿疹、ペチジン塩酸塩で静脈炎あり。

【経過と薬剤師の対応】ペガシス・コペガスによる治療で症状、検査値も落ち着いていたが、体が重いとの自覚症状、AST、ALT の上昇を認めたため、加療目的で平成 22 年 9 月 8 日入院。指導薬剤師の指導の元、薬学実習生としてプロブレムリストを作成し、患者を担当した。またこの症例は C 型慢性肝炎や治療薬、副作用等に関する質問が多く、患者の理解を深めるために、各質問に対して調査、回答した。

○プロブレムリスト＃１：ペガシス・コペガス併用療法が原因と思われるＷＢＣ、ＳＥＧ減少による感染の可能性。→　感染の予防方法、検査結果の見方等の指導。

○副作用について：メジャーな副作用、前回治療時の湿疹発現の確認と、今回治療時の早期発見法と対処についての指導。マイナーな副作用、インフルエンザ様症状、かゆみ、消化器症状、貧血等の確認と対応法の指導等。

○質問への回答：質問例、IFN の用量と効果および副作用の関係→IFN を増量すると効果があることは確認されているが、180μg を超えての安全性は確認されていない。

WBC、SEG に関しては標準治療では減量等の処置を行う必要がある数値まで低下したが、感染の兆候が認められないこと、体調の回復、ALT（176→35）AST（155→45）の低下が認められ、さらに退院後も自己管理可能との判断で、H22 年 11 月 17 日退院となった。

【考察】C 型慢性肝炎の治療は長期にわたる上に、副作用対策も重要である。特に今回の症例はインターフェロン＋リバビリンの組み合わせで重篤な副作用を経験しているだけに、現在同じ組み合わせの治療を行っており、早期発見につながる初期症状はきちんと理解してもらう必要がある。入院時には医師、看護師のみならず、薬剤師も含めたチームで患者教育を実施、薬剤師も毎日訪問し、副作用の症状や対処法、質問に回答することによって、患者の理解を高めることによって、長期の治療に貢献できると考えられる。

【参考文献】C 型慢性肝炎の治療ガイドライン、厚生労働省　肝炎等克服緊急対策事業　肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究班 (2010).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-179	氏　名	西牧沙織
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	喘息患者の理解度調査		

【目的】入ステロイド剤の普及で気管支喘息の死亡者数は減少しているが、実際に発作を起こしている患者を目の当たりにしている。ガイドラインでも自己管理の重要性が挙げられているが、きちんと自己管理ができているか、また実際どれくらいの人が発作を起こしているのか、など気管支喘息患者の現状についてのアンケート調査を実施した。

【方法】アンケート内容は性別、年齢、罹病歴等の対象の基礎データから、最近の発作の有無、気管支喘息に対する理解度、使用薬剤、特に吸入剤に関する内容、さらにコントローラーとリリーバーに関する知識、使用状況、発作時の対応等とした。2009 年 6 月から 7 月にかけて、呼吸器内科の医院において、受付時にアンケート用紙を渡し、記入していただいた。

【結果】アンケート回収数は 60 枚であり男女数はそれぞれ 30 名、平均年齢は 38.8 歳で、平均治療期間は 12.2 年であり、いずれも男女間で差は認められなかった。吸入剤を使用している割合は 7 割であった。最近では 16.7%が発作を起こしており、気管支喘息は死亡することがあること、発作が起きていない時の治療が重要であることは 8 割以上が理解しており、コントローラーとリリーバーの違い、コントローラーの重要性は 7 割以上が理解していた。吸入剤を使用していると回答した 42 名の中で、吸入剤を正しく理解していた患者は 7 割弱であり、合剤を含む吸入ステロイド剤を使用している患者は 6 割であった。さらに発作時に使用するリリーバー常に持っている患者は約 3 割にとどまっただけでなく、リリーバーを持っていない時に発作が起きた経験は 10 名が経験ありと回答した。薬の中断については、21.7%の 13 名が経験ありと回答しており、喘息は治らないと考えているのは全体の 25%の 15 名であり、6 割が治ると考えていた。気管支喘息に関して自分で調べた経験がある患者数は 24 名いたが、情報が役に立った数は 25%の 15 名であった。

【考察】気管支喘息治療のガイドラインでは、発作の無い状態を保ち、正常な肺機能を維持し、健康な人と変わらない日常生活ができるように適切な自己管理を行うことが大切である、とされている。男女差については、女性の方の関心が高いものの、全体的に知識が無い人が想像以上に少なかったものの、喘息を軽く見ている人がいることを知り、服薬指導の重要さを改めて実感した。また、吸入ステロイドが処方されているにも関わらず発作があるということから吸入薬の使用方法が間違っているのかもしれない。中断した人の割合は多くはなかったが、治療の中断者はゼロが望ましい。吸入ステロイドの普及により喘息死が減少しているということも知られており、使用法や発作時の薬だけでなく吸入ステロイドの重要性、安全性も服薬指導時に伝えていく必要があると考えられる。

【結論】気管支喘息死を減らすにはガイドラインに沿った適切な治療を行うとともに、患者が正しい知識を持ちかつ実践するように、医師、看護師、薬剤師を含めた医療スタッフが連携を取って、繰り返し患者を指導していくことが必要である。

【参考文献】大田　健、喘息予防・管理ガイドライン 2009、JGL2009 のポイント、日本病院薬剤師会雑誌、9、1237-1239 (2010).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-180	氏　名	廣木　茜
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	保険調剤薬局来局者の OTC に関する意識調査		

【目的】今日では高齢化に伴いセルフメディケーションへの関心が高まっている。しかし、使用する方が、必ずしも適当な情報を得られているとは限らない上に、誤った情報の流布や解釈が思わぬ健康被害を引き起こす可能性もある。薬事法改正による医薬品の分類、販売方法など様々な事が変化しているが、この制度は始まったばかりであり、一般の方がどれくらい理解しているか不明である。そのため、調剤目的で来局した患者を対象にアンケートを実施し、一般用医薬品（OTC）の認識に関する調査を行った。

【方法】千葉市内のドラックストアに協力して頂き、来局者へアンケート調査を行った。本研究の目的を説明し、同意が得られた患者を対象に、平日、最も混雑が予測される午前中に聞き取る方法による調査を実施した。アンケート調査は、OTC の特徴、購入に関すること、分類や情報に関すること、また OTC の分類に関しては、具体的な OTC 名を出して、購入できる店舗などの調査を実施した。

【結果】回答者は男女合わせて 104 名（平均年齢 62.8 歳）であり、性別による差は認められなかった。医療用医薬品と OTC があることは 8 割以上が知っており、最も多い情報源はテレビであった。OTC は比較的効果が弱いことは 8 割以上が知っていたが、複数の有効成分を含む配合剤が多いことを知っていたのは半数以下であった。OTC の分類については、第 1 類、2 類、3 類医薬品、医薬部外品について購入可能な店舗の質問に対して、「医薬品は全てドラックストアと薬局で購入出来る事が可能である」との回答が最も多かったものの、第 1 類がスーパーやコンビニで購入できるとの回答が 1 割近くあることや、スーパーやコンビニなど薬剤師の居ない環境下で一部の OTC を購入出来ることは知っているのは 2 割弱であった。医薬品購入時に薬剤師の説明を受けた経験があったのは 6 割近かったが、第 1 類 OTC の販売に薬剤師の書面による説明の義務化を知っているのは半数以下であった。

【考察】一般の方は、薬事法の改正による OTC の分類はよく理解できておらず、OTC の購入者は薬剤師の必要性はなんとなく感じ取っているようであるが、医薬品の分類との関連は全く知られてないと考えてもよい。しかし、薬の購入時に改訂に伴った不便さなど現実に直面した時に初めて再認識するとの回答が多かった。薬を買う上で重視しているのはブランドや CM に流れる OTC など、日常よく見かけるものが多いと考えられる。しかし、購入者はあくまで『安さ』『使いやすや』『効果』などを見ている為、思わぬ相互作用の原因になる要因がアンケート内でいくつか挙がる結果になった。薬剤師は薬の情報提供だけではなく『誰が』『いつ』『何故使うのか』などもきちんと聞きとる事が重要な役割の 1 つである。

【結論】一般の方は OTC に関して関心はあるものの、その内容や分類などの知識は乏しく、セルフメディケーションの推進には積極的な啓蒙活動を行っていく必要がある。

【参考文献】日薬情報 No. 209、新たな医薬品販売制度への対応、日本薬剤師会雑誌、61、1461-1464 (2009)、武政文彦、日本薬剤師会雑誌、62、623-626 (2010).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-215	氏　名	海野 芳枝
所属研究室	薬物治療学研究室		
研究テーマ	プロテインアレイを用いたステロイド処理による表皮角化細胞内タンパク質の発現変動解析		

研究概要

【目的】ステロイド薬は、抗炎症作用や免疫抑制作用を期待して様々な疾病に用いられているが、副作用も発現しやすいことから、薬剤選択や投与量の決定には十分に注意する必要がある。外用薬は薬効の強さによりランク付けされているが、これは血管収縮試験や皮膚委縮試験に臨床医の使用感を加味して分類されており、絶対的な基準とは言えない。また、血管収縮試験の効果判定は目視によって行われており、客観性に乏しい。そこで、客観性を有する指標となり得るバイオマーカー候補の探索を目的とし、プロテインアレイを用いてデキサメタゾン（DEX）処理の細胞内変動タンパク質の発現変動解析を試みた。

【方法】ヒト表皮角化細胞に対する DEX および 0.1% エタノール（コントロール）の細胞増殖への影響を MTS assay を用いて評価した。DEX は 10^{-9}、 10^{-8}、 10^{-7}、 10^{-6} または 10^{-5} M の濃度を用い、各濃度について 37℃、5% CO_2 存在下、6、24 または 48 時間処理を行った。プロテインアレイによる発現変動解析ではコントロールおよび 10^{-6} M DEX により 37℃、5% CO_2 環境下で 48 時間処理した後タンパク質を回収したものを試料とした。各タンパク質試料を Cy3 および Cy5 により標識した後、異なる蛍光色素で標識された試料を混合し同一アレイ上の抗体と反応させた。蛍光イメージアナライザーを用いて蛍光強度を検出した後、β-アクチンを内部標準として 128 種類のタンパク質についてディファレンシャルディスプレイを行った。

【結果】MTSassay において、コントロールと DEX 処理後の細胞増殖率に差は認められなかった。ディファレンシャルディスプレイにおいて、DEX 処理により発現量が 2 倍以上変動したタンパク質を検出した結果、増加が認められたタンパク質は CyclinD3、Estrogen Receptor および FAK Y397 (Phospho-Specific)であった。一方、発現量が減少したタンパク質は 14-3-3σ、CDC25C、ErbB2 Y1248 および Keratin20 であった。

【考察】発現量が変動した各タンパク質の機能について、CyclinD3、Estrogen Receptor および FAK Y397 (Phospho-Specific) は細胞増殖の活性化作用を有し、14-3-3σおよび CDC25C は細胞増殖の抑制作用を有することがわかった。このことから、CyclinD3、Estrogen Receptor、FAKY397 (Phospho-Specific)の発現量増加と 14-3-3σ、CDC25C の発現量減少は、DEX の細胞増殖促進作用によるものと推察された。一方、ErbB2 Y1248 あるいは Keratin20 と DEX の作用との関連性については報告が見当たらなかったが、バイオマーカー候補としての可能性を検討していきたいと考えている。

【結論】プロテインアレイを用いた検討から、DEX 処理により発現量が変動するタンパク質を検出することができた。今後、ウエスタンブロット法などを用いて確認し、ステロイド薬のランク分類に利用可能なバイオマーカー候補としての有用性を検討していきたい。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-020	氏　名	郡川　晶子
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	リファンピシンモノオキシゲナーゼの精製と結晶化		

【目的】*Nocaldia farcinica* は人畜共通の日和見感染、ノカルジア症の原因菌である。感染すると長期間に渡る難治性の症状が現れる。*N. farcinica* は多くの抗生物質に自然耐性を示すことが特徴的である。自然耐性の理由として抗酸菌と同様に抗生物質の疎水性細胞壁による低透過性であると考えられてきた。しかし *N. farcinica* の全ゲノム配列が解明され、種々の抗生物質に対する耐性遺伝子が発見されたことで否定された。その中でリファンピシンに対する耐性の機序に今回研究した *rox (rifampicin monooxygenase)* が関与している。*rox* によってリファンピシンの 2’ 位に酸素が導入され、抗菌活性の著しく低い 2’-N-hydroxy-4-oxo-rifampicin へと代謝されることで *N. farcinica* は耐性を示す。この時の外見的な変化としてリファンピシンの独特の色が代謝によって脱色される。*rox* の X 線結晶解析を目的として *rox* の発現・精製し、結晶化条件のスクリーニングを行った。

【方法】ベクターの pColdI のマルチクローニングサイト (*Nde*I-*Bam*HI) に rox 遺伝子を挿入し、pColdrox とした。大腸菌 BL21 (DE3) で形質転換を行い、Amp 耐性コロニーを選択した。2xYT 培地で後期対数期になるまで 30 ℃で培養し、IPTG (0.5 mM) 添加、及び 15 ℃に温度を下げることで選択的に発現誘導を行った。約 20 時間培養後、菌体を遠心集菌 (4,500 xG) 超音波波砕後、菌体波砕物を遠心分離 (30,000 xG) し、上清を粗酵素サンプル液とした。HisTrap^{TM}HP では Ni アフィニティカラムに対しての Imidazol 濃度のグラジエントによる溶出を行った。イオン交換カラム HiTrap Q HP では陰イオン交換体に対しての塩濃度のグラジエントによる溶出を行った。ゲルろ過カラムによって更に精製し、バッファーを 2 mM HEPES に交換しながらタンパク質を 17.7 mg/ml まで濃縮した。これを用いて Hanging Drop 法によって 48x3 種類の結晶化条件のスクリーニングを行った。

【結果・考察】8 L の培養液から 36.24 mg の精製タンパク質が得られた。SDS-PAGE の結果より精製度は 95 %以上であると見積もられる。このタンパクで 144 種類中 4 種類の条件で微結晶が見られ、その中の 20 % PEG 1000, 0.2 M $Ca(OAc)_2$ が含まれた条件での再現性が良好だった。pH の最適化を行ったところ、pH 7.0~7.5 で最も大きな結晶が確認された (0.2~0.4 mm) 。高エネルギー加速機研究機構の BL-NE3A で X 線回折実験を行ったところ、低解像度付近でのみ回折像が得られた。このことから結晶はタンパク質由来のものであることが確認できた。しかし、空間群結晶定数を決定するには不十分なデータであった。

【今後の展望】今回の結晶では構造解析を進めることができず、引き続きスクリーニングの続行、条件の最適化、再検索、His タグを切断して精製・結晶化、ベクターの再考などを行う。

【参考文献】 Hoshino, Y. et. al J. Antibiot (Tokyo) , 2010, Vol.63 (1) : 23-8

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-023	氏　名	笹子　恵
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	NDM-1 金属 β-ラクタマーゼの精製		

【目的】NDM-1 は New Delhi metallo-β-lactamase の略で、*Klebsiella pneumonia* や *Escherichia coli* から分離された種々のβ-ラクタム剤を加水分解するβ-ラクタマーゼである。2010 年 NDM-1 産生菌が多剤耐性院内感染菌として TV、新聞等のメディアで報道された。NDM-1 は活性中心に亜鉛を持つメタロβ-ラクタマーゼである。ほとんどのセリンβ-ラクタマーゼでは分解できないカルバペネム系β-ラクタム剤をはじめ、セフェム系、ペニシリン系共に分解可能な広域スペクトルβ-ラクタマーゼである。NDM-1 の立体構造 X 線結晶構造解析により明らかにするために酵素の大腸菌における発現系と精製法の確立を試みた。

【方法】 NDM-1 遺伝子はそのアミノ酸配列からコドンを大腸菌に最適化して塩基配列を決定し、人工的合成された。これを pET48b の XmaI-BamHI サイトに導入し pETNDM1 とした。この遺伝子は発現時に N 末端に His Tag、HRV3C プロテアーゼ切断部位を持つようにデザインされている。pETNDM1 を大腸菌 BL21 または GEN-X に導入して M9 培地中 30℃で後期対数増殖期まで培養し、IPTG（0.5 mM）を加え発現誘導し、その後 20℃で 15h 培養を行った。遠心集菌（4,000xG）後、超音波にて菌体を破砕し、破砕物を遠心（30,000xG）により除き、上精を粗酵素抽出液とした。種々の条件でニッケルアフィニティカラム（His Trap ™ HP GE Hearth care）を利用したクロマトグラフィーを行い各ピークフラクションにおいて SDS-PAGE によりタンパク質の分子量、純度を確認した。得られたピークフラクションを HRV3C プロテアーゼと混合し 4℃ 24h 消化し、His Trap によりにより不要なペプチド及び HRV3C プロテアーゼを取り除いた。ここで用いたプロテアーゼも NDM-1 同様 His Trap を用いて *E. coli* rosetta/pET3CPRO より簡易精製したものである。また、酵素活性はアンピシリンの基質として 230 nm の吸光度の減少により測定した。

【結果・考察】得られた粗酵素サンプルを His Trap を用いて精製したところ、クロマトグラフィーの UV チャート上に単一ピークが観察された。この SDS-PAGE から、37 kD 付近に太いバンドが観察された。また、そのピークフラクションをプロテアーゼにより His tag 切断後 His Trap にかけフロースルーを収集し SDS-PAGE を行ったところ 25 kD 付近に濃い単一バンドが見られた。500 mM イミダゾールによる溶出物の SDS-PAGE を行ったところ 16 kD 付近に特に濃いバンドとその他のマイナーバンドが観察された。37 kD と 25 kD のバンドをもつフラクションチューブから酵素活性が確認された。これらから 37 kD のバンドには His Tag を含むβ -ラクタマーゼが活性型として存在し、プロテアーゼにより 16 kD ほどの His Tag が切断され、25 kD ほどの目的の活性型β -ラクタマーゼが精製されたと考えられる。今回の手順で SDS-PAGE から 99%以上の精製度を得ることができたが、さらにゲル濾過クロマトグラフィーの手順を加え、結晶化のサンプルとしたい。

【参考文献】

Antimicrob, Agents Chemother.2009, Vol. p.5046-5054

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-095	氏　名	横山　武弘
所属研究室	生理化学講座		
研究テ-マ	MRSA のβ-ラクタム耐性機構と抗 MRSA 薬		

【目的】

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)は院内感染の起因菌の1つであり、依然として高い分離頻度を占めている。その治療薬としてvancomycin (VCM)、arbekacin (ABK)、teicoplanin (TEIC)、linezolid (LSD)が承認されている。MRSA感染症は、他にグラム陰性菌(特に緑膿菌)との混合感染が多く、それらの治療と予防を目的とした抗MRSA薬とβ-ラクタム薬との併用投与が一般的に行われている。また、β-ラクタム薬の投与中にMRSAが検出される場合も多々認められており、抗MRSA薬を追加併用される症例も認められている。特にVCMとβ-ラクタム剤の併用療法は長年にわたり汎用されている。一部のMRSAはその環境に適応しており、VCMとβ-ラクタム剤の併用で拮抗作用を示す、つまりβ-ラクタム剤によりVCM耐性が誘導されるMRSAが検出され始めている。そこで、MRSAに感受性をしめすβ-ラクタム剤を開発できれば、良いのではないかと考え本研究を行った。

【結果・考察】

β-ラクタム剤はPBP(penicillin binding protein)に結合し、ペプチドグリカン層を架橋し細胞壁をより強固するために必要なトランスペプチダーゼ活性を失活させ、細胞内圧に菌が耐えられなくなり溶菌することにより殺菌作用を示す。しかしながらMRSAはβ-ラクタム剤との親和性が低いPBP2'を持つため、β-ラクタム剤存在下でもトランスペプチダーゼ活性を維持し、生存することができるので、耐性化する。PBP2'に親和性の高いβ-ラクタム剤の開発が出来れば抗MRSA性のβ-ラクタム剤として期待が出来る。本研究でβ-ラクタム剤のPBP2'高親和性のセフトビプロール(Figure1)がスイス、カナダ、ウクライナで静脈注射薬として認可されているが日本ではPhaseⅢ開発段階である。今臨床適用されているLSDはMRSAに静菌的に作用するが、セフトビプロールは上記の機序により殺菌的に作用するのでMRSAによる菌血症等の合併症防止効果を示し、将来性の高い医薬品である

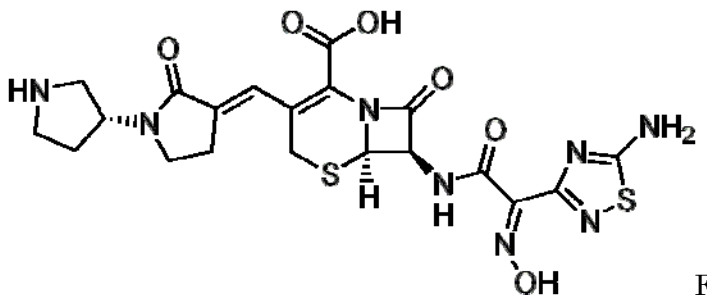


Figure1

【主要参考文献】

柳沢　千恵ら,The Japanese Journal of Antibiotics,2005,51巻,p11-16

Malcolm G P Page,Curr Opin Pharmacol ,2006,Vol6 ,p480-485

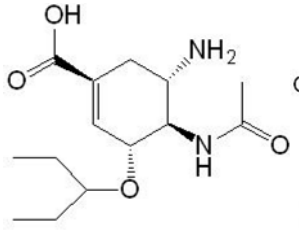
卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-097	氏　名	赤井　荘史
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	新抗インフルエンザ治療薬と従来の抗インフルエンザ治療薬との相違		

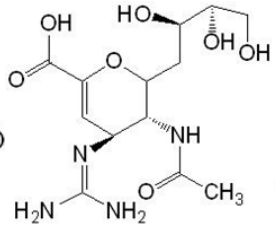
●目的

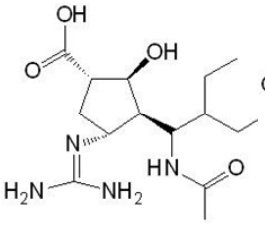
毎年、インフルエンザ感染症に対して感染拡大を予防するために、抗インフルエンザ薬のタミフル、リレンザが大量に処方されてきた。2009 年のインフルエンザのパンデミックでは、豚由来のタミフル耐性をもつ新型インフルエンザウイルスの発生報告もされ、大きな問題となった。2010 年には新しくラピアクタ、イナビルの２剤が認証・販売されたが、従来のタミフル、リレンザと新薬のラピアクタ、イナビルの４剤とも、効果については“ノイラミニターゼを阻害する。”という説明だけされている。それぞれの薬の効果の違いについて、これら四つのノイラニミターゼ阻害薬を比較して調査を行った。

●結果　ノイラミニターゼ（以下 NA）とは、宿主細胞内で増殖し細胞表面で凝集したウイルス群を細胞表面から切り離すことで拡散させるインフルエンザウイルスの増殖に必須のウイルスを構成しているタンパク質であることがわかった。



（代謝活性体）





（代謝活性体）

商品名	タミフル	リレンザ	ラピアクタ	イナビル
一般名	オセルタミビル	ザナビミル	ペラミビル	ラニナミビル

NA との阻害結合では 4 剤とも共通で持つカルボキシル基が NA 活性部位とイオン結合するのに加えて、タミフルとラピアクタが持つペンチルオキシ鎖が NA 活性部位の疎水的な部分と疎水結合し、リレンザ、ラピアクタ、イナビルの３剤が共通して持つグアニジノ基が NA の活性部位にあるアミノ酸のグルタミン酸の残基と、イオン結合することが分かった。

●考察・これからの抗インフルエンザ薬

リレンザとイナビルのように、1 つの置換基を変更することで効果効能を増すような改造が行われてきた。今後も既存の薬の構造に手を加えて新薬を開発されるだろうが、現在富山化学工業株式会社が、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼを阻害する新薬「ファビピラビル」を米国で臨床第Ⅱ相試験中であり、この新薬が日本でも認証されれば、従来の耐性菌に対しての治療も含めてインフルエンザ感染症に対して２つのアプローチから治療をすることが期待できる。

●参考文献　山下　誠　蛋白質　核酸　酵素　Vol.54　No.10　1284－1291　(2009)
白石京子　等　インフルエンザ　Vol.3　No.3　53－59（2002－7）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-119	氏　名	柴田　真裕
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	AUF1 を用いたストレス顆粒因子の検索		

【目的】細胞は化学物質、温度、浸透圧、紫外線などの刺激によってストレス顆粒(SGs)という一過性の細胞質内構造体を形成する。SGs は mRNA、RNA 結合タンパク質および 40S リボソームを含むことが明らかにされている。SGs の形成は、異常タンパク質の蓄積を防ぎ、ストレスによる損傷から細胞を防御し、アポトーシスを誘導する。SGs に取り込まれた mRNP の翻訳を一時的に停止するので、SGs はストレス条件下における翻訳抑制を司る細胞内コンパートメントであると考えられ、SGs 内に存在する mRNA の安定性を制御するタンパク質の役割が重要視されている。5'-非翻訳領域(5'-UTR)の terminal oligo pyrimidine(TOP)および 3'-非翻訳領域(3'-UTR)-AUUUA-への結合が知られる AUF1(A-U rich binding factor1)は、新規 SGs タンパクと報告された。AUF1 は核におけるスプライシング制御の因子としても知られている。本研究では AUF1 の SGs 移行を免疫抑制剤ラパマイシ ン(RPM)および熱ショックによるストレスにより誘導し、その SGs 形成メカニズムを検討した。

【方法】AUF1 のエキソン 2 およびエキソン 7 の有無により生じる p37、p40、p42、p45 と GFP をフュージョンした pEGFP をトランスフェクションしたヒト子宮頸癌細胞(HeLa)を DMEM 培地で培養し、RPM(100ng/ml)添加後 2 時間培養したもの、42℃、30 分間熱処理したもの、未処理の 3 つの条件にわけ固定し、anti-PABP(mouse)、anti-p38MAPK(rabbit)を一次抗体として、TRITC（二次抗体/Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate）を用い可視化し、AUF1 と TRITC の蛍光を指標に細胞内局在を蛍光顕微鏡で比較した。また、細胞より細胞質内を遊離している遊離リボソーム(FP : free polysome)を含む細胞質、細胞骨格に結合している細胞骨格結合リボソーム(CBP : cytoskeleton binding polysome)を分画し、ショ糖密度勾配遠心でさらに分画した。RPM、熱ショックと未処理間でのタンパク質の状態をウェスタンブロット法を用いて比較検討した。

【結果・考察】ウェスタンブロットでは FP において RPM 存在下で、p37、p40、p42、p45 すべてにバンドの変化は見られなかった。一方、CBP では 5'-UTR の TOP に結合すると考えられている p42、p45 のみ変化が見られた。AUF1 は RPM 処理によりポリソームへの分布が減少し、mRNA の翻訳効率の低下が見られた。

また、GFP-AUF1 を蛍光顕微鏡で比較すると、熱ショックによるストレス条件下では、p37、p40、p42、p45 すべてで AUF1 が細胞質で顆粒状に分布し、SGs に移行している事を確認できた。RPM 添加条件下では p37、p40 では AUF1 の移行は確認できず、確認できず、p42、p45 では確認できた。以上より、AUF1 は熱ショックに対してはすべてが SGs へ移行することが認められたが、p37、p40 と p42、p45 では RPM に対しては差が見られ、3'-UTR に結合する p37、p40 では SGs を形成せず、5'-UTR の TOP に結合し、エキソン 7 が発現している p42、p45 のみ RPM に呼応した SGs を形成している可能性がある。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-120	氏　名	菅谷　優美
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	一般用医薬品登録販売者の育成カリキュラムと受験準備実態に関するアンケート調査		

【背景】一般用医薬品登録販売者（登録販売者）制度に係る規定について、改正薬事法が平成 20 年 4 月 1 日より施行された。現在就業者の受験者は減少傾向にあるが、毎年試験は実施されている。店舗販売業（ドラッグストア）で実務経験のある人が登録販売者資格を取得するだけでなく、高卒者も資格取得をするようになった。登録販売者専門学校も増設しており、今後、高卒者は登録販売者の受験資格を得るために、1～2 年在籍の専門学校を利用する者が大半を占めるようになると予想される。しかし、現場の登録販売者には経営のスキルや医療人として高い意識が必要とされている。

【目的】登録販売者に必要とされる経営のスキルや医療人としての意識を明らかにする目的で、資格取得までに必要とされた情報・準備期間等を調査し、また登録販売者の育成システムの現状について考察した。

【方法】①専門学校卒業生以外の受験者（あるいは企業の教育担当者）に対して準備期間・延べ時間・就業期間を千葉県のドラッグストアで働く登録販売者にアンケートを依頼した。
（期間：平成 22 年 6 月 2 日～平成 22 年 11 月 28 日）
②登録販売者の受験資格を取得できる専門学校（関東圏内の 6 校）の、カリキュラム（座学の合計時間、授業の内容等）の実態調査を行った。

【結果・考察】アンケート回答数は 116 枚であった。登録販売者試験の合格者の 94%が薬局・ドラッグストア勤務であり、その 75%が勤務先で研修を受けた。勤続年数を見ると資格所有者は 2～9 年勤務の方が多い。このことより、現場で働いている方が合格しやすいと考えられる。すなわち新卒者では、実務経験が足りないと考えられる。

資格取得後に 7 割が自身の成長を実感し、その理由として情報提供技術の向上、売り上げ貢献を挙げていた。資格取得により満足感・充実感を 73%が得ている。取得後 71%で雇用の待遇が改善され、その理由は昇給が最も多く挙げられた。しかし、資格取得準備の負担に比べて改善の変化は軽微で、資格所有者の待遇制度に問題がある可能性がある。

主に医薬品販売業務を行っている者は 30%であった。説明頻度は、1 日当たり 5 回以内が 63%であった。資格所得者は医療人としての自覚が高まったと思われるが、セルフメディケーション推進への貢献は多大であるとは言えない。

受験準備での座学期間は約 9 割が 2 年未満、8 割が 1 年未満であった。勉強時間は 1 日当たり 3 時間未満が 9 割であった。受験準備で最も難解の項目は、薬事関係法規・制度 35%、主な医薬品とその作用 30%、人体の働きと医薬品 28%が挙げられた。

登録販売者向けカリキュラムについて専門学校 6 校中 3 校は、パソコン実習が薬学部と同等である。6 校中 2 校が手話、ポップアート、調剤コンピュータ演習など特徴的な科目が導入されていた。資格取得に必要最低限な座学科目に加え、登録販売者に必要とされる経営や、資格所有者としてのスキルを向上するために、登録販売者育成システムは、最低限 2 年制が適正であると思われる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-135	氏　名	平賀　香奈
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	HaCat 細胞を用いた実験創傷治癒における shikonin 応答系の解析		

【目的】紫雲膏は創傷治癒促進作用などがあり、あかぎれ、あせも、切り傷、および火傷に使用されている。ヒトケラチノサイト細胞（HaCat 細胞）を用いた実験創傷治癒（AWH）系において、紫雲膏の成分である shikonin は創傷治癒促進作用を示すことが明らかになっている。しかし、shikonin により創傷治癒関連遺伝子がどのような発現調節を受けているかは明らかになっていない。本研究では創傷治癒に関与していると明らかになっている遺伝子の中で、shikonin により発現調節を受ける遺伝子の検索を行った。

【方法】コンフルエントにまで培養した HaCat 細胞（6 well plate）をプラスチック製の櫛を用いて、細胞剥離面を作成した後、shikonin（40ng/ml）存在下・非存在下で pH 6.8 の DMEM でさらに培養した。剥離面作成後 3 時間および 16 時間に集めた細胞より全 RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析（Filgen 社）を行い、shikonin の有無での遺伝子発現量に 2 倍以上の増加あるいは 2 分の 1 以下の減少が見られた遺伝子を同定した。shikonin により正・負の発現調節を受けることがトランスクリプトーム解析で確認された遺伝子のうち、創傷治癒への関連が知られる遺伝子 12 種類について同条件で培養した細胞を用いて RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

【結果・考察】トランスクリプトーム解析の結果、HaCat 実験創傷治癒系において shikonin により 2 倍以上あるいは 2 分の 1 以下の発現量を示した遺伝子は（1）3 時間後、16 時間後ともに増加した群、（2）3 時間後で増加し 16 時間後で有意な差が見られない群、（3）3 時間後で増加し 16 時間後で増加した群、（4）3 時間後で有意な差が見られなかったが 16 時間後で増加した群、（5）3 時間後で有意な差が見られなかったが 16 時間後で減少した群、（6）3 時間後で減少し 16 時間後で増加した群、（7）3 時間後、16 時間後ともに減少した群、（8）3 時間後で減少し 16 時間後で有意な差が見られなかった群、の 8 つに分類することができ、52,582 プローブ中、1,708 プローブで有意（$p<0.05$）な変化が見られた。このうち、創傷治癒に関与していると考えられる 17 種類の遺伝子のうち 12 種類の遺伝子について RT-PCR を行ったところ、少なくとも 3 種類の遺伝子についてトランスクリプトーム解析と相関性が示唆された。

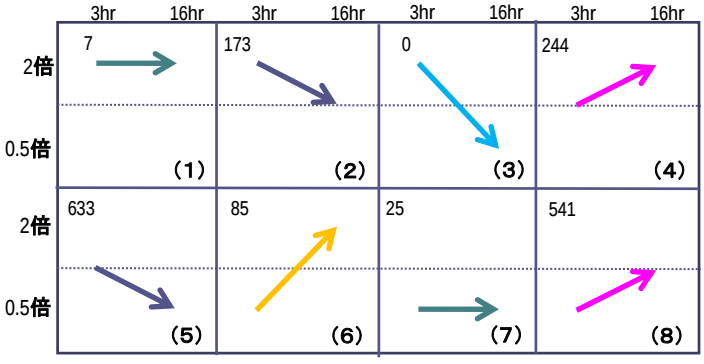


図. HaCat 実験創傷治癒系において shikonin により 有意（$p<0.05$）な発現調節を受けたプローブ数

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006－181	氏　名	古荘　諭美
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	14 員環マクロライド系抗生物質が核内関連因子の細胞内動態に及ぼす影響		

【目的】マクロライド系抗生物質は、リボソーム 50S サブユニットに結合することでタンパク質合成を阻害し、抗菌作用を示す一方、「マクロライド療法」では、14 員環マクロライドの少量長期投与は、DPB や COPD などに対して抗炎症作用を発揮し症状を緩和する。しかし、少量長期投与により 14 員環マクロライドは核内に蓄積することが示唆されているが作用発現に至る細胞内標的分子は明らかになっていない。本研究では、転写及び messenger RNA の成熟に関わる核内因子の挙動に対して 14 員環マクロライドが与える影響について検討した。

【方法】HeLa 細胞（RPMI 培地中）にエリスロマイシン（EMA：50 μg/ml）、クラリスロマイシン（CAM：25 μg/ml）、ロキシスロマイシン（RXM：25 μg/ml）の添加の有無で、それぞれ 150cm² シャーレ 2 枚に 72 時間培養した。集めた細胞より、核質を抽出し、更に、10～30%グリセロール密度勾配で超遠心分離を行い、9 本のフラクションに分画した。核内タンパク質の発現量を検討するために、各フラクション中のタンパク質を TCA 沈殿により濃縮し、SDS - PAGE を施用した後、Western blot 法により解析した。また、LPS 前処理した A549 細胞（DMEM 培地、30cm²）を CAM 添加の有無で 72 時間培養した後、micro RNA 発現を網羅的に解析した。

【結果・考察】SDS - PAGE で分離後、10～30%グリセロール密度勾配フラクション中のタンパク質をクマシー染色して観察したところ、RXM 処理により数種類のバンドの増減がみられた。同一試料の Western blot 法により、SF2/ASF（スプライシング因子）について調べたところ、SF2/ASF の各フラクション毎の局在は RXM 処理により変化しなかったが、被リン酸化の減少が観察された。LPS 前処理した A549 細胞の 10～30%グリセロール密度勾配フラクションでは、CAM 添加により LPS 未処理とは異なるバンドの増減が認められた。同様に処理した A549 細胞の micro RNA の網羅的解析では、1 種の micro RNA が有意な増加を示す一方、15 種の半減が明らかとなった。これらの半減した 15 種の micro RNA のうち、8 種についてはがん細胞で発現の増加が報告されている（2011 年 4 月現在）。以上より、マクロライド処理した細胞では核内でのスプライシング能が低下している可能性が考えられる。一方、特異的 micro RNA の発現量の変化により特にがん化に傾ける働きをもつ遺伝子の messenger RNAs の安定性が影響を受けている可能性が考えられる。近年、がん抑制遺伝子において messenger RNA の転写・成熟に関与する核内因子との関連性や、がん化と micro RNA の関係を示す報告が多くされている。14 員環マクロライドの抗がん作用や抗炎症作用は、messenger RNA の成熟やその後の安定性に影響を及ぼすことで示されている可能性が考えられる。

学籍番号	PC2006-209	氏　名	平尾　絵梨子
所属研究室	生理化学研究室		
研究テーマ	NDM-1 産生多剤耐性菌由来マクロライドエステラーゼの精製		

【目的】 近年、院内感染菌として報道されている NDM-1（New Delhi metallo-□-lactamase-1）を産生する菌は、多剤耐性であることが知られており臨床的に制圧困難となっている。NDM-1 産生菌はインテグロン上に *bla*NDM-1 以外に様々な抗生物質に対する耐性遺伝子を持ち、多剤耐性化している。この中でマクロライド系抗生物質耐性遺伝子として *ere*C が同定されている。*ere*C はエリスロマシンエステラーゼをコードし、この酵素はマクロライドの環内エステル結合を加水分解し不活化する。マクロライドエステラーゼの立体構造は現在まで解析されておらず、この酵素の X 線構造解析を目的として精製を行った。

【方法】エステラーゼ遺伝子はそのアミノ酸配列をもとに人工合成を行った。pET48b の HRV3C プロテアーゼ切断サイトをコードする領域直後の *Xma*I サイトと MSC の *Bam*HI サイトを利用してフレームが合うようにクローニングを行い、これを pETEREC とした。これを *Esherishia coli* BL21（DE3）または BL21 Gen-X をホストとして 2xYT 培地または M9 培地 1L 中 30℃で後期対数期まで培養を行い、IPTG（0.5 mM）を加えて発現誘導を行った。その後、20℃で 16 時間培養を継続した。遠心集菌（4,000xG）の後、超音波破砕を行い、菌体破砕物を遠心除去（30,000xG）し、上清を粗酵素サンプルとした。酵素精製は、Ni-アフィニティーカラムクロマトグラフィー（His Trap™ HP GE Hearth care）で行い、Imidazole 濃度のグラジエントにより、溶出した。次に N 末端にある His-Tag を切り取るために HRV3C プロテアーゼ消化を 24 時間 4℃で行った。HRV3C プロテアーゼは、pET3CPRO を *E. coli* Rossetta 株に導入し、上述のように菌を破砕したのち、His Trap™ HP を用いて簡便に精製し使用した。後処理にも His Trap™ HP を用い、フロースルーに目的タンパク質が存在することを確認した。

【結果・考察】His Trap™ HP での特異的結合における Imidazole 濃度条件の比較試験では Imidazole 0、10、20、50 mM の 4 条件で行い、各ピークフラクションにおいて SDS-PAGE を用いてタンパク純度を確認した。Imidazole 0mM では、非特異的なタンパク質が His-Tag カラムに結合していたが、その他の条件では非特異的吸着は抑制され Imidazole 濃度による大きな差はみられなかった。これらの結果から、結合バッファーには Imidazole 20 mM を添加することにした。宿主大腸菌と培地の組み合わせの中でクロマトグラフィーのピークと SDS-PAGE のパターンから *E.* coli Gen-X/2xYT が最も効率的にエステラーゼが発現することが明らかとなった。続けて行った SDS-PAGE からは Gen-X/M9 がその他の条件に比べ純度・収量が高いことが確認された。これらの結果から、Gen-X/M9 での培養で最も効率よく発現することが明らかとなった。またピークフラクションを HRV3C プロテアーゼによる His-Tag 切断を試みたが 24 時間 4℃消化後も切断が不完全であり、消化済みエステラーゼ（46 kDa）、His-Tag（14 kDa）、HRV3C プロテアーゼ（20 kDa）、未消化エステラーゼ（60 kDa）の全てが SDS-PAGE より確認され今後消化条件の再検討を行う必要がある。

【参考文献】Nucleic Acids Research Vol.14,1986,p.4987-4999
Antimicrob,Agents Chemother.2009,Vol.53,p.5046-5054

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-044	氏　名	村山　美優
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	厚生労働省への製造販売承認申請を目的とした 医薬品の臨床試験（治験）における有効性評価のためのエンドポイント―乳癌治療薬―		

【目的】承認申請を目的とした医薬品開発における臨床試験について、乳癌治療薬の臨床試験（治験）で使用された有効性評価のための臨床的エンドポイント及びバイオマーカーを調査し、現時点で繁用されているエンドポイント（主要評価項目及び副次評価項目）を抽出するとともに、臨床的エンドポイントとバイオマーカーとの関連性と臨床薬理試験の利用法を考察した。

【方法】2009 年 11 月 24 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 22 年 1 月承認の新有効成分含有医薬品（223 成分）に区分される抗悪性腫瘍薬のうち、乳癌の効能又は効果をもつ 6 成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、カペシタビン、エキセメスタン、トラスツズマブ（遺伝子組換え）、及びアナストロゾール）、3 成分（カペシタビン、トラスツズマブ（遺伝子組換え）、及びアナストロゾール）の審査報告書（厚生労働省作成）及び臨床試験成績に関する評価資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 3 成分は共同研究者の PC2006-047 山本有佳里の調査対象である）。

【結果】有効性の主要評価項目として臨床的エンドポイント（奏効率等）が設定された臨床試験（臨床薬理試験を含む）は 3 成分すべてで実施され、さらにバイオマーカー（血清中エストラジオール濃度等）が設定された臨床試験はアナストロゾールのみであった。また、副次評価項目として臨床的エンドポイント（主要評価項目以外の臨床的エンドポイント）が設定された臨床試験は 3 成分すべてで実施され、さらにバイオマーカー（主要評価項目以外のバイオマーカー）が設定された臨床試験は 3 成分すべてであった。アナストロゾールにおいて、血清（血漿）中のエストラジオール及びエストロン濃度等と臨床的エンドポイント（抗腫瘍効果）との関連性が検討されたが、相関は認められなかった。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果を持つ 3 成分において、臨床的エンドポイントとバイオマーカーとの関連性について、承認申請資料で未記載（カペシタビン及びアナストロゾール）もしくは関連性は認められない（トラスツズマブ（遺伝子組換え））とされ、現段階では、バイオマーカーと臨床的エンドポイントの十分な関連性は認められていないと考えられる。一方、トラスツズマブ（遺伝子組換え）の審査報告書において、PMDA から申請者に対してバイオマーカーと臨床的エンドポイントの関連性について照会した記載があることから、PMDA は両者の関連性に注目していると考えられる。

【結論】有効性評価のためのバイオマーカーを用いた臨床薬理試験は 3 成分すべてで実施されているが、バイオマーカーと臨床的エンドポイント（抗腫瘍効果が繁用されている）の間に明らかな相関は認められないので、バイオマーカーによる薬効評価の困難性を示すと考えられた。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報,
URL: http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html　[Accessed 2010 June 10]

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006‐045	氏　名	柳沼　孝明
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	臨床用量・曝露レベルと無毒性量・曝露レベルからみた医薬品の安全性評価－乳癌治療薬－		

【目的】承認申請を目的とした医薬品開発において、医薬品の安全性は毒性試験によって担保されており、無毒性量及びトキシコキネティクスはヒトにおける安全性評価において有用な情報である。今回、臨床用量及び無毒性量の関係に加え、ヒトと動物における曝露レベルの関係を調査し、医薬品の安全性プロファイルを評価した。

【方法】2009 年 11 月 24 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 21 年 7 月承認の新有効成分含有医薬品（207 成分）に区分される抗悪性腫瘍剤のうち、乳癌の効能又は効果をもつ５成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、カペシタビン、エキセメスタン及びトラスツズマブ）、2 成分（エキセメスタン及びトラスツズマブ（遺伝子組換え））の審査報告書（厚生労働省作成）及び承認申請資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 3 成分は共同研究者の PC2006-088 藤田美由貴の調査対象である）。安全性プロファイルは、非臨床及び臨床試験成績を基に無毒性量／臨床用量の比としての安全係数、曝露レベルについては、動物の血中濃度（C）／ヒトの血中濃度（C）の比としての安全係数、及び動物の血中濃度時間曲線下面積（AUC）／ヒトの血中濃度時間曲線下面積（AUC）の比としての安全係数を算出して評価した。

【結果】投与量レベルの安全係数は全２成分で得られ、いずれも安全係数が＞1.0 であった。 曝露レベル（C）の安全係数は全２成分で得られ、いずれも安全係数が＞1.0 であった。また曝露レベル（AUC）は 1 成分（エキセメスタン）のみ承認申請資料に記載があり、安全係数は＞1.0 であった。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果をもつ抗悪性腫瘍剤（２成分）において、投与量及び曝露レベル（C）の安全係数はいずれも＞1.0 を示した。このような安全係数を示す薬物の臨床試験では臨床用量が無毒性量を下回り、また臨床用量での曝露レベル（C）が無毒性量での曝露レベル（C）を下回るため、探索的・検証的な臨床試験の実施にあたっては、安全性評価に対する特別な配慮の必要性は低いと考えられる。

【結論】対象とした 2 成分の用量及び曝露レベル（C）の安全係数は＞1.0 を示したが、一方でこれらの安全係数が＜1.0 の安全性プロファイルを示す薬物の臨床試験では、設定された用量が毒性試験での無毒性量を超え、また設定された用量での曝露レベルが無毒性量での曝露レベルを超えるため、探索的・検証的な臨床試験の実施にあたっては、安全性評価に対する十分な配慮が必要と考えられる。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報　平成 22 年 6 月 10 日アクセス
URL:http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-047	氏　名	山本　有佳里
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	厚生労働省への製造販売承認申請を目的とした 医薬品の臨床試験（治験）における有効性評価のためのエンドポイント―乳癌治療薬―		

【目的】承認申請を目的とした医薬品開発における臨床試験について、乳癌治療薬の臨床試験（治験）で使用された有効性評価のための臨床的エンドポイント及びバイオマーカーを調査し、現時点で繁用されているエンドポイント（主要評価項目及び副次評価項目）を抽出するとともに、臨床的エンドポイントとバイオマーカーとの関連性と臨床薬理試験の利用法を考察した。

【方法】2009 年 11 月 24 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 22 年 1 月承認の新有効成分含有医薬品（223 成分）に区分される抗悪性腫瘍薬のうち、乳癌の効能又は効果をもつ 6 成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、カペシタビン、エキセメスタン、トラスツズマブ（遺伝子組換え）、及びアナストロゾール）、3 成分（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、及びエキセメスタン）の審査報告書（厚生労働省作成）及び臨床試験成績に関する評価資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 3 成分は共同研究者の PC2006-044 村山美優の調査対象である）。

【結果】有効性の主要評価項目として臨床的エンドポイント（奏効率等）が設定された臨床試験（臨床薬理試験を含む）は 3 成分すべてで実施され、さらにバイオマーカー（血清中エストラジオール濃度等）が設定された臨床試験は 2 成分（レトロゾール、及びエキセメスタン）であった。また、副次評価項目として臨床的エンドポイント（主要評価項目以外の臨床的エンドポイント）が設定された臨床試験は 3 成分すべてで実施され、さらにバイオマーカー（主要評価項目以外のバイオマーカー）が設定された臨床試験は 3 成分すべてであった。2 成分（レトロゾール及びエキセメスタン）において、血清（血漿）中のエストラジオール及びエストロン濃度等と臨床的エンドポイント（抗腫瘍効果）との関連性が検討されたが、相関は認められなかった。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果を持つ 3 成分において、臨床的エンドポイントとバイオマーカーとの関連性について、承認申請資料で未記載（ラパチニブ及びレトロゾール）もしくは関連性は認められない（エキセメスタン）とされ、現段階では、バイオマーカーと臨床的エンドポイントの十分な関連性は認められていないと考えられる。一方、エキセメスタンの審査報告書において、PMDA から申請者に対してバイオマーカーと臨床的エンドポイントの関連性について照会した記載があることから、PMDA は両者の関連性に注目していると考えられる。

【結論】有効性評価のためのバイオマーカーを用いた臨床薬理試験は 3 成分すべてで実施されているが、バイオマーカーと臨床的エンドポイント（抗腫瘍効果が繁用されている）の間に明らかな相関は認められないので、バイオマーカーによる薬効評価の困難性を示すと考えられた。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報,
URL: http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html　[Accessed 2010 June 10]

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-084	氏　名	永森　瑠璃子
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	厚生労働省への製造販売承認申請を目的とした日本人被験者対象の第 I 相試験における初回投与量―乳癌治療薬―		

【目的】承認申請を目的とした第 I 相試験の初回投与量は、旧「臨床試験の一般指針」で「十分に安全と見込まれる用量」とされ、「抗悪性腫瘍薬の第 I 相試験のガイドライン（案）」では、外国の他の人種で決定された最大耐量（MTD）もしくは最大許容量（MAD）の 1/2 量以上に設定することができるとされている。今回、承認情報を調査し、初回投与量設定における非臨床試験成績の利用法を評価した。

【方法】2010 年 7 月 4 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 22 年 7 月承認の新有効成分含有医薬品（223 成分）に区分される抗悪性腫瘍薬のうち、乳癌の効能又は効果をもつ 5 成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物 、レトロゾール 、カペシタビン 、エキセメスタン 、およびトラスツズマブ(遺伝子組換え) ）、3 成分（ラパチニブトシル酸塩水和物 、カペシタビン 、およびトラスツズマブ(遺伝子組換え)）の審査報告書（厚生労働省作成）、および承認申請資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 2 成分は共同研究者の PC2006-104 内山みさきの調査対象である）。50%致死量（LD_{50}）又は概略の致死量、無毒性量、および主な薬効発現用量（初回投与量に最も近い予想を示す薬効薬理試験成績）を用い、「臨床薬理学第 2 版」（日本臨床薬理学会編）で示された設定基準により算出した予想初回投与量と、第 I 相試験での治験実施計画書で規定された初回投与量とを比較した。さらに、非臨床試験成績を基に（無毒性量）/（主な薬効発現用量）の比（安全係数）を算出した。

【結果】第 I 相試験の初回投与量（ラパチニブトシル酸塩水和物：日本人固形癌患者を対象に 1 回 900mg を 1 日 1 回 21 日間経口投与、カペシタビン：日本人悪性腫瘍患者を対象に 502mg/m^2/日を 1 日 2 回朝夕食後に 6 週間以上経口投与、トラスツズマブ（遺伝子組換え）：日本人 HER2 過剰発現の進行・再発乳癌患者を対象に、1 回（1 日）1mg/kg に生理食塩液を加え 250ml とし、90 分かけて点滴静脈内投与）は、全 3 成分とも薬効薬理試験成績からの予想に近似した。また、安全係数は 0.1（ラパチニブトシル酸塩水和物）、0.22（カペシタビン）、および 0.32（トラスツズマブ（遺伝子組換え））といずれも＜1.0 を示した。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果をもつ抗悪性腫瘍薬（3 成分）において、初回投与量は薬効薬理試験成績からの予想に近似した。また、安全係数はいずれも＜1.0 を示したことから、第 I 相試験では安全性に対する十分な配慮が必要と考えられた。

【結論】一般的に第 I 相試験では毒性試験成績が重視されるが、今回検討した 3 成分の初回投与量はいずれも薬効薬理試験成績からの予想に近似していたことから、毒性試験において特に安全性上の問題がなければ、薬効薬理試験を用いた開発戦略が採用されていることが示唆された。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報
URL：http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html　[Accessed 2010 July 4]

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-088	氏　名	藤田　美由貴
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	臨床用量・曝露レベルと無毒性量・曝露レベルからみた医薬品の安全性評価－乳癌治療薬－		

【目的】承認申請を目的とした医薬品開発において、医薬品の安全性は毒性試験により担保されており、無毒性量及びトキシコキネティクスはヒトにおける安全性評価において有用な情報である。今回、臨床用量及び無毒性量の関係に加え、ヒトと動物における曝露レベルの関係を調査し、医薬品の安全性プロファイルを評価した。

【方法】2009 年 11 月 24 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 21 年 7 月承認の新有効成分含有医薬品（207 成分）に区分される抗悪性腫瘍剤のうち、乳癌の効能又は効果をもつ 5 成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、カペシタビン、エキセメスタン及びトラスツズマブ）、3 成分（ラパチニブトシル酸塩水和物、レトロゾール、カペシタビン）の審査報告書（厚生労働省作成）及び承認申請資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 2 成分は共同研究者の PC2006-045 柳沼孝明の調査対象である）。安全性プロファイルは、非臨床及び臨床試験成績を基に無毒性量／臨床用量の比としての安全係数、曝露レベルについては、動物の血中濃度（C）／ヒトの血中濃度（C）の比としての安全係数、及び動物の血中濃度時間曲線下面積（AUC）／ヒトの血中濃度時間曲線下面積（AUC）の比としての安全係数を算出して評価した。

【結果】投与量レベルの安全係数は全 3 成分で得られ、2 成分（カペシタビン、ラパチニブトシル酸塩水和物）の安全係数が＜1.0 であった。曝露レベル（C）の安全係数は 1 成分（ラパチニブトシル酸塩水和物）で得られ、安全係数が＜1.0 であり、曝露レベル（AUC）の安全係数は全 3 成分で得られ、そのうち 1 成分（ラパチニブトシル酸塩水和物）が＜1.0 であった。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果をもつ抗悪性腫瘍剤（3 成分）において、投与量及び曝露レベル（C 及び／もしくは AUC）の安全係数が＜1.0 である成分が認められた。このような安全性プロファイルを示す薬物の臨床試験では、設定された用量が毒性試験での無毒性量を超え、また設定された用量での曝露レベルが無毒性量での曝露レベルを超えるため、探索的・検証的な臨床試験の実施にあたっては、安全性評価に対する十分な配慮が必要と考えられる。

【結論】臨床用量が無毒性量を上回り、臨床用量での曝露レベル（C 及び AUC）が無毒性量での曝露レベル（C 及び AUC）を上回る成分として、ラパチニブトシル酸塩水和物があった。また、カペシタビンも臨床用量が無毒性量を上回った。探索的試験の開始前に得られるヒトでの安全性情報は、通常、第 I 相試験で得られる程度のものしかない。第 I 相試験では、無毒性量を超える投与量が設定される場合があり、反復投与における安全性評価は十分でない。開発会社にとっては、このような安全性プロファイルを有するものの臨床試験において、十分な安全性評価が可能となる治験実施計画書を作成する必要がある。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報　平成 22 年 6 月 10 日アクセス
URL:http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-104	氏　名	内山　みさき
所属研究室	生物薬剤学研究室		
研究テーマ	厚生労働省への製造販売承認申請を目的とした日本人被験者対象の第 I 相試験における初回投与量―乳癌治療薬―		

【目的】承認申請を目的とした第 I 相試験の初回投与量は、旧「臨床試験の一般指針」で「十分に安全と見込まれる用量」とされ、「抗悪性腫瘍薬の第 I 相試験のガイドライン（案）」では、外国の他の人種で決定された最大耐量（MTD）もしくは最大許容量（MAD）の 1/2 量以上に設定することができるとされている。今回、承認情報を調査し、初回投与量設定における非臨床試験成績の利用法を評価した。

【方法】2010 年 7 月 4 日付けインターネットで公表された、平成 13 年 4 月～平成 22 年 7 月承認の新有効成分含有医薬品（223 成分）に区分される抗悪性腫瘍薬のうち、乳癌の効能又は効果をもつ 5 成分中（ラパチニブトシル酸塩水和物 、レトロゾール 、カペシタビン 、エキセメスタン 、およびトラスツズマブ(遺伝子組換え) ）、2 成分（レトロゾール、およびエキセメスタン）の審査報告書（厚生労働省作成）、および承認申請資料（承認取得者作成）を調査対象とした（他の 3 成分は共同研究者の PC2006-084 永森瑠璃子の調査対象である）。50%致死量（LD_{50}）又は概略の致死量、無毒性量、および主な薬効発現用量（初回投与量に最も近い予想を示す薬効薬理試験成績）を用い、「臨床薬理学第 2 版」（日本臨床薬理学会編）で示された設定基準により算出した予想初回投与量と、第 I 相試験での治験実施計画書で規定された初回投与量とを比較した。さらに、非臨床試験成績を基に（無毒性量）/（主な薬効発現用量）の比（安全係数）を算出した。

【結果】第 I 相試験の初回投与量（レトロゾール：日本人閉経後健康女性に対して 0.25mg を絶食下で単回経口投与、エキセメスタン：日本人閉経後健康女性に対して 25mg を絶食下で単回経口投与）は、全 2 成分とも毒性試験成績からの予想に近似した。また、安全係数は 3（エキセメスタン)、および 30（レトロゾール）といずれも＞1.0 を示した。

【考察】今回調査した乳癌の効能又は効果をもつ抗悪性腫瘍薬（2 成分）において、初回投与量は毒性試験成績からの予想に近似した。また、安全係数はいずれも＞1.0 を示したことから、第 I 相試験における安全性は十分に担保されていると考えられた。

【結論】一般的に第 I 相試験では毒性試験成績が重視されるが、今回検討した 2 成分の初回投与量はいずれも毒性試験成績からの予想に近似していたことから、行政ガイドラインに準拠した開発戦略が採用されていることが示唆された。

【参考文献】医薬品医療機器総合機構新薬承認情報
URL：http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku_index.html　[Accessed 2010 July 4]

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-024	氏　名	佐藤　貴之
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	新規ペプチドのラット脂肪由来幹細胞増殖活性に関する研究		

【目的】

幹細胞は優れた分化能を有し、細胞療法や再生医療における利用が期待されている。幹細胞を実際の再生医療等に利用する場合、大量の幹細胞を調製することが必要となってくる。しかし、幹細胞自体の調製が困難でありその増殖効率も再生医療に用いるほど増殖効率が高くないのが現状である。Li -Wen らは、SSVLYGGPPSAA 配列を有するペプチド（以後、SSV ペプチドという）が幹細胞増殖活性を有することを報告した。SSV ペプチドの幹細胞増殖活性の分子メカニズムは明らかになっていないが、SSV ペプチドは免疫抑制活性を有する抗ヒストン H1 モノクローナル抗体と特異的に結合することが報告されている。SSV ペプチドと同様に、抗ヒストン H1 モノクローナル抗体と結合活性を有するペプチドとして、LPQNVWLHGWHT 配列ペプチド（以後、LPQ ペプチドという）も報告されているが、本ペプチドの幹細胞増殖活性については明らかとなっていない。そこで本研究では、LPQ ペプチドの幹細胞増殖活性について明らかにし、その効果について SSV ペプチドとの比較を行うことを目的として実験を行った。

【方法】

Adipose tissue-derived stromal cells（ADSC）の同定：ラット脂肪細胞から単離した細胞を FITC ラベルされた抗体で染色し、蛍光顕微鏡と flow cytometry で確認した。

ADSC に対する LPQ の増殖効果 : ADSC に CFSE を添加し、新規ペプチドの細胞増殖活性を SSV ペプチドと比較し flow cytometry で確認した。

【結果】

ADSC の同定：蛍光顕微鏡で観察したところ、抗 CD29 抗体、抗 CD44 抗体、抗 CD90 抗体では蛍光が認められ、抗 CD83 抗体では蛍光が認められなかった。また、flow cytometry で確認したところ、抗 CD29 抗体では蛍光が認められ、抗 CD45 抗体では蛍光が認められなかった。

ADSC に対する LPQ の増殖効果：細胞増殖によって、細胞内に取り込まれた CFSE の蛍光強度が減少することを指標として SSV ペプチドあるいは LPQ ペプチドの幹細胞増殖活性を評価したが、SSV および LPQ 添加群とコントロール群で蛍光強度に違いは認められなかった。

【考察】

ADSC の細胞表面には CD29、CD44、CD90 が発現しており、一方で CD45、CD83 は発現していないことが報告されている [1]。ADSC 細胞表面に発現しているタンパク質に対する抗体のみで蛍光観察がされたことから、ラット脂肪細胞から ADSC が単離できたことが確認された。しかし、得られた ADSC を用い LPQ の増殖効果について調べたところ、LPQ ペプチドだけでなく SSV ペプチドにおいても細胞増殖効果が認められなかった。今後、細胞数、蛍光色素量、培養時間等検討して実験系の確立を行った後、再度 LPQ の効果について検証する予定である。

【参考文献】

1) *STEM CELLS* 2007;**25**:818-827

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-061	氏　名	尾ヶ瀬　拓真
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	免疫抑制活性を有する抗体における complementarity determining region の同定に関する研究		

【目的】レミケード（抗ヒト TNF-α抗体；リウマチ治療薬）に代表される抗体医薬品は、2000 年代初頭から上市されはじめ、現在本邦では約 10 種類、世界では約 20 種類が上市されている。抗体医薬品の開発プロセスは、シーズ探索・抗原同定から始まり、抗体作製・ヒト化抗体あるいは完全ヒト抗体作製へと進み、前臨床試験、臨床試験、製造方法の確立を経て上市に至る。ヒト化抗体あるいは完全ヒト抗体の作製は、基礎研究から前臨床試験へと医薬品開発を進めていく上での重要なステップの一つである。ヒト化抗体の作製方法としては、Resurfacing 法、Complementarity determining region （CDR） grafting 法、Superhumanization 法の大きく分けて 3 つの方法がある [1)]。いずれの方法においても、抗体が抗原を特異的に認識する超可変領域、CDR の同定が必要不可欠である。

中野らは肝臓移植後の血清中に産生されてくる抗ヒストン H1 抗体が免疫抑制性活性を有することを発見した。さらに、江らはファージディスプレイ法を用いて免疫抑制性抗体の抗原配列を同定し、その抗原を用いて新規免疫抑制性抗体を作製した。本抗体は *in vitro*, *in vivo* においてコントロール群に比べて有意に高い免疫抑制活性を示したが、マウス抗体であることから、今後本抗体を基礎研究から医薬品開発へと繋げていくためにはヒト化抗体を作製して効果を確認していくことが必要となってくる。そこで本研究では、ヒト化抗体作製のためにマウス抗体の CDR を同定することを目的として実験を行った。

【方法】本抗体の cDNA ライブラリーを５´-RACE 法により可変領域遺伝子を精製した後、精製した遺伝子を pGEM-T easy ベクターとライゲーションした。ライゲーション後、E.coliDH5α へのトランスフォーメーションを行い、シークエンス用のプラスミドを精製した。精製した遺伝子配列について、web 上のツール(http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html、http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html)を用いて解析を行った。CDR 部分の同定は Kabat あるいは Chothia の２種類の方法により可変領域アミノ酸配列に番号付けを行った。以上により本抗体の可変領域部分における CDR 領域とその周りのフレームワーク領域を同定した。

【結果・考察】CDR の配列は重鎖、軽鎖の CDR 領域１、２、３それぞれ１０未満のペプチドで構成されている。Kabat あるいは Chothia による番号付けによると、CDR 領域においてアミノ酸５個程度のずれが認められた。これは Kabat による番号付けがアミノ酸の 1 次構造を基本にしているのに対して、Chothia による番号付けが 2 次構造（ループ構造）を基本にしていることによるものと考えられる。今後、これら 2 種の CDR 配列をもとにマウス抗体のヒト化抗体を検討していく予定である。

【参考文献】*Protein Engineering, Design &Section* **vol.23** no.12 pp 947-954,2010

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-115	氏　名	呉　裕華
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	経皮ワクチンアジュバント Coenzyme Q10 のアジュバント活性発現メカニズムに関する研究		

【目的】Coenzyme Q10（以後、CoQ10 という）は、ミトコンドリア内膜や原核生物の細胞膜に存在する電子伝達体であり、炭素鎖が 10 のイソプレン側鎖を有するベンゾキノン誘導体である。CoQ10 は、抗酸化作用や免疫賦活作用を有しており[1)]、一般用医薬品や化粧品等に配合され販売されている。一方、皮膚免疫を利用する経皮ワクチンは、細胞性免疫および液性免疫のいずれも誘導することが可能であることに加えて、免疫応答経路が他の免疫成熟化の経路と異なるため、既存の投与ルートでワクチン化が困難であった疾患に対するワクチンの開発やコンプライアンス向上を目的としたワクチンの開発が期待されている。ワクチン開発において、投与ルート、抗原、アジュバント、ワクチン処方の最適化が重要であるが、未だ最適な経皮ワクチン用アジュバントは確立していない。佐藤、後藤らは、免疫抑制活性を有する抗体を誘導するための経皮ワクチン用アジュバントとして CoQ10 が有用であることを報告した。しかし、詳細な免疫応答の分子メカニズムについては分かっていない。本研究では CoQ10 のアジュバント活性の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、樹状細胞の成熟化に CoQ10 が関与しているかどうか調べた。

【方法】B6 マウスより脾臓を摘出し、MACS Column を用いて樹状細胞を分離精製した。分離精製した樹状細胞は、表面抗原に特異的な抗体を用いて FACS により樹状細胞であることを確認した。精製した樹状細胞を、10%FBS 含有 RPMI 溶液に溶解させた CoQ10 溶液に添加し、樹状細胞成熟化の指標となる表面抗原の発現量変化について FACS を用いて調べた。25μM 以上の濃度では CoQ10 は 10%FBS 含有 RPMI 溶液に溶解しなかったため、CoQ10 の濃度として 25μM，12.5μM，5μM，2.5μM で検討を行った。

【結果】樹状細胞が成熟化したとき、細胞表面に高発現する CD83 を指標として CD83 に対する抗体を用いて FACS により樹状細胞の成熟化を評価した。このとき、ネガティブコントロールとして CD45 に対する抗体を用いた測定も行った。実験の結果、CoQ10 刺激後、CD83 および CD45 の両者の発現量に違いは認められなかった。CoQ10 非存在下と 25μMCoQ10 存在下でも比較を行ったが変化は認められなかった。これらの結果から、CoQ10 は樹状細胞の成熟化には関与していない事が明らかとなった。

【考察】本結果から、CoQ10 が樹状細胞の成熟化には関与していないことが明らかとなった。免疫賦活作用メカニズムの一つとして、ウイルスやバクテリアなどに特徴的な分子が樹状細胞や抗原提示細胞表面のレセプターに結合することでシグナル伝達が起こり、免疫応答が誘導されるメカニズムがある。膜貫通型レセプターとしては TLR 等が、また細胞質型レセプターとしては RLRS や NLRS などが存在し、アジュバントの一つである Alum は NLRS の NALP3 を介することが報告されている。今後、各レセプターに対する CoQ10 の作用を調べ、アジュバント活性メカニズムの明らかにする予定である。

【参考文献】1) *J. Immunology*, **Vol. 183**,6186－6197(2009)

2)　*ファルマシア*, **46(1)**, 61-65(2010)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-138	氏　名	松田　秀樹
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	片頭痛のイオントフォレーシス製剤の有用性評価～スマトリプタンの血中濃度分析方法の確立～		

【目的】現在、片頭痛の発作時の治療薬としてトリプタン系が第一選択薬となっており、その中で一番即効性なのがスマトリプタンである。スマトリプタンの剤形には注射・点鼻・経口があり、それぞれメリットとデメリットが存在する。それぞれのデメリットを改善しつつより即効性の期待できる投与方法としてイオントフォレーシスによる経皮吸収型製剤に着目した。イオントフォレーシスは薬物を電気エネルギーによって皮膚から透過させる方法である。イオントフォレーシスのメリットとして吸収速度が速い、携帯可能、悪心・嘔吐を伴う場合でも投与可能、疼痛がない、使用法が簡便、薬の投与をいつでも中止できる等があり、臨床で使用されているスマトリプタン製剤の短所を補い、適切な量の薬物を送達できると考えた。スマトリプタンのイオントフォレーシス製剤化に向けて、ラットにおける血中濃度の分析方法の確立を目的とした。

【方法】血清又は精製水からの抽出法：血清サンプル由来の夾雑ピークの影響を確認するため、精製水と血清のそれぞれを用いて前処理を行った。コニカルチューブに概知濃度のスマトリプタンを含有したラット血清又は精製水を 0.25mL を入れ、2M HCl 50μL とジエチルエーテル 4mL を加えた。この試料溶液を 10 分間振とうし、遠心分離を行った。有機層を除去後、8M NaOH 100μL とジエチルエーテル 6mL を加え、10 分間振とうし、遠心分離を行った。有機層 5mL を別のコニカルチューブへ移し、窒素でパージし留去した後に HPLC の移動相を 0.25mL 加え溶解し、HPLC で分析を行った。

HPLC 定量法：蛍光検出器（Ex：225nm、Em：350nm）を使用し、カラムは ODS 4.6×250mm を用い、移動相はアセトニトリル：0.25mM pH 6 リン酸バッファー（23：77）又はアセトニトリル：0.25mM NaH2PO4(16：84) pH3.3 とした。スマトリプタンの濃度は薬物のピーク面積から、絶体検量線法により算出した。

【結果・考察】スマトリプタン水溶液からの抽出率は 96.7±2.3%であった。また、血清に溶解させた試料を分析したクロマトグラフから、生体内の物質のピークとスマトリプタンのピークを分離することができ、特異性が認められた。血清からのスマトリプタンの抽出率に関しては 81.9±1.3%となっており補正の範囲内と判断した。

抽出操作を行った 5 濃度（67.5ng/mL～1000ng/mL）のスマトリプタン含有血清サンプルから近似直線は y=689.61x－3664 で、相関係数は 0.9997 が得られ直線性が認められた。

【結論】本抽出法により血清中におけるスマトリプタンの特異性と直線性を確認することができた。本研究で確立した抽出法および測定法を用いて、イオントフォレーシスによるスマトリプタンの in vivo 血中濃度測定に応用する。

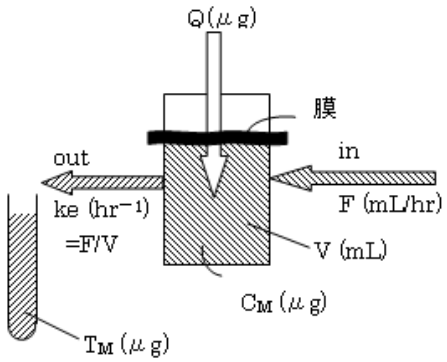
【参考文献】１：Z.Ge,E.Tessier etc. Journal of Chromatography B,806(2004)299-303
２：MJ.Nosal etc. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30(2002)285-291

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-147	氏　名	阿部　春香
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	*In vitro* 膜透過吸収試験法の数学的評価に関する研究		

【目的】*In vitro* の膜透過試験法では一定時間毎に自動でサンプリングする方法（フロースルーセル法:FT 法）が一般に用いられている。FT 法は実験中セル内の溶液を長時間に渡って一定量試験管に集めることができ、試験管に集まった溶液の濃度と液量 F(mL/hr)を乗して、透過量(T_M)としている。そのためセル内の薬物量(C_M)が透過量として反映されず、薬物透過量を正確に求めることができていない。Sclafani[1)]らはこの点を補正するため非線形最小二乗法(MULTI-FILT)を用いてシミュレーションにより求める方法を報告しているが、特殊なコンピュータソフトを用いる等、簡便な方法とは言い難い。そこで２つのモデルを用いて簡便に正確な透過量を求める方法を検討した。

【モデル】FL 法：Donor 層にある薬物は Q (μg)ずつ膜を透過し、体積 V (mL)の receiver 層へ移動する。試験中、生理食塩水が外部から F (mL/h)の流速で receiver 層に送液され、同量がチューブに採取される。この時チューブ内の薬物を T_M (μg)、receiver 層の薬物を C_M (μg)とする。一般に透過量は T_M として示される。モデル 1：コンパートメントモデルを用いて時間を t とし、receiver 層からの消失速度定数を ke (=F/V)とすると、セル中の薬物量とチューブ中の薬物量は次式で示される。



$$\frac{dC_M}{dt} = Q - KeC_M, \qquad \frac{dT_M}{dt} = KeC_M$$

t=0 のとき、$C_M = C_0$ としてこの式を解くと

$$C_M = \frac{Q}{Ke}\{1-\exp(-ke\cdot t)\} + C_0\cdot\exp(-ke\cdot t)$$

$$Q = \frac{T_M - C_0\{1-\exp(-ke\cdot t)\}}{t - \{1-\exp(-ke\cdot t)\}/ke}$$

この２式を用いて C_M を補正した透過量を求める。モデル２:n 回目のサンプリング終了時の receiver 層の薬物濃度(C_M /V)を n 回目と n+1 回目のチューブ内の薬物濃度の平均として C_M を補正して透過量を求める。

【方法】透過試験:モデル薬物としてジクロフェナクナトリウム(50mg/mL)を、モデル膜としてシリコン膜(75μm)、有効透過面積 1.77 cm^2 のフロースルーセルを用いて、receiver の流速を 1.47mL/h または 5.74mL/h として 8 時間に渡って透過試験を行った。

【結果・考察】流速を 1.47mL/h と 5.74mL/h とし、補正しないで透過量を求めると、8 時間目での薬物透過量はそれぞれ 12.57μg/cm^2、23.05μg/cm^2 と流速以外同じ条件で実験しているにもかかわらず、約 2 倍近い差が見られた。これをモデル 1 により補正すると前者は 35.95μg/cm^2、後者は 31.22μg/cm^2 と差は見られなかった。またモデル 2 を用いて 7 時間目までの累積透過量を求めると前者は 28.71μg/cm^2、後者は 25.68μg/cm^2 と差は見られなかった。

【結論】今回検討した補正方法によって、より簡便に正確な透過量を求められる。

【参考文献】J. Sclafani, Pharm. Res., **10**, 1521, 1993

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-151	氏　名	岩根　利恵
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	β遮断薬の経皮吸収型製剤の高血圧ラットを用いた薬効評価		

【目的】降圧薬のコンプライアンスの観点から、医療現場では長時間作用型の製剤が望まれている。医療現場にある１日１回投与の経口剤より長時間作用させるには、1 週間持続型の経皮吸収型製剤の設計が考えられる。経皮吸収型製剤は、副作用が出れば剥がせるということ、貼っていることが目視できること、投薬回数を減らせることなど、安全性やコンプライアンスの向上に繋がる。一方、薬物として選択したβ遮断薬は、高血圧、不整脈、狭心症の循環器系疾患に対して広く使用されており、本薬の 1 週間持続型経皮吸収型製剤は医療現場で降圧薬治療のベースの製剤となることが期待できる。また、β遮断薬の薬理作用としては交感神経優位時（朝-日中）に優れた効果を示し、副交感神経優位時（夜間）には過剰な効果（副作用）を示さないとされている。

そこで、１週間有効血中濃度を維持できるように設計されたβ遮断薬（フマル酸ビソプロロール）経皮吸収型製剤には、夜間睡眠時の過剰な血中降下を招くことなく、一定の血圧を保つことができ、早朝高血圧も回避できる有用性があると考え、自然発症高血圧ラット(ＳＨＲ)を用いて、血圧の日内変動を観察した。

【方法】自然発症高血圧ラット(ＳＨＲ)の血圧測定は、非観血血圧測定装置(softlon BP98-A)を用いて行った。平常時と製剤投与時に、3 時間おきに 24 時間測定し、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍を記録し、日内変動を観察した。１週間有効血中濃度を維持できるように設計されたβ遮断薬（フマル酸ビソプロロール）経皮吸収型製剤は、膜制御リザーバー型の経皮吸収型製剤を用いた。尚、本製剤はヒト皮膚透過試験で一週間の放出が確認されている。

【結果・考察】自然発症高血圧ラット(ＳＨＲ)の平常時血圧は、活動期（暗期）と非活動期（明期）で、日内変動があることを本測定方法で確認できた。本製剤貼付時は、活動期（暗期）血圧が低下するという特徴ある結果となった。本製剤は、貼付 4 時間後より薬効として血圧低下を確認でき、また日内変動観察期間の薬物経皮吸収が維持できていることは、薬効の維持で間接的に確認した。また、本製剤剥離時の皮膚刺激は低いものであった。本結果は、β遮断薬特有の薬理作用が自然発症高血圧ラット(ＳＨＲ)においても確認でき、交感神経優位時に優れた効果を示し、副交感神経優位時には過剰な効果を示さないとことを示唆している。

【結論】交感神経活動亢進は血圧上昇の原因となるのみならず、不整脈、虚血性心疾患といった心血管疾患発症に関連する。心筋梗塞や脳卒中の発症は早朝から午前中に多く、交感神経活動亢進による早朝の血圧上昇が病態形成に関わっていることが示唆されている。持続型のβ遮断薬（フマル酸ビソプロロール）経皮吸収型製剤は、急激な血圧降下を示さないだけでなく、血中濃度を一定に維持しても夜間の過度の血圧降下を示さず、活動期の血圧を制御できることから、有用性（安全性、有効性）・使用性に優れた製剤である。

【参考文献】　ラットの血圧と心拍数の日内変動-SD ラットとＳＨＲの比較-　片平　清昭

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-163	氏　名	神谷　絵美
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	イオントフォレーシスを用いたスマトリプタン経皮吸収製剤の製剤設計に関する研究　～安定性からのアプローチ～		

【目的】スマトリプタンは、偏頭痛治療薬として使用されているセロトニン 5-$HT_{1B/1D}$ 刺激薬である。現在、注射薬、経口薬や点鼻薬が上市されている[1,2]。しかし注射薬では効果発現は速いものの穿刺による痛みや使用が限られる等の欠点がある。経口薬では携帯可能で服用が簡便であるが、作用発現が遅く、悪心・嘔吐を伴う場合の服用が困難である。また、点鼻薬は比較的作用発現が速く携帯可能であるが咽頭に流入すると苦みを呈する等の欠点がある。これらの剤形の欠点を改善できる投与方法としてイオントフォレーシスを用いた経皮投与が考えられる[3]。イオントフォレーシスとは電気エネルギーを利用して主にイオン性薬物の経皮吸収の促進を目的に利用されている。この方法により現在上市されている偏頭痛治療薬製剤の欠点を補い適切な量の薬物を迅速に送達できると考えられる。今回の検討では製剤中でのスマトリプタンの安定性向上に着目した製剤設計を行った。

【方法】安定性試験：水溶液中でのスマトリプタンの安定性を調べる目的で pH 3～8 の緩衝液(Briton-Robinson 緩衝液[3])又は水に 1μg/mL スマトリプタンを溶解させた。これをアンプルに注入し密封後 60℃で 2 週間保存し、各 pH におけるスマトリプタンの安定性を調べた。安定性が良好であった水、pH5、6 の緩衝液にスマトリプタンを溶解させ加熱冷却しポリビニルアルコールゲルを作成し、これを銀電極及び発泡ポリオレフィンから成るデバイスに添加しイオントフォレーシス製剤を作成した。この製剤をアルミ包材に入れ 40℃で 3 カ月間保存し安定性を調べた。定量法：HPLC を用いて定量法を行った。移動相は 25mMNaH_2PO_4 と 25mM$NaHPO_4$ を混合し pH7.5 としたリン酸緩衝液とアセトニトリルを 23:77 で混合した。測定には蛍光検出器(Ex:225nm、Em:350nm)を用いた。ゲルの抽出方法：ナスフラスコにゲルとメタノール 20mL を入れ 30 分間加熱還流させた後メタノール溶液をメスフラスコに入れた。この操作を 4 回繰り返し 100mL にメスアップしこれを測定した。

【結果・考察】スマトリプタンの水溶液中での安定性は pH 3 では 54.0%、pH 4 では 81.8%、pH 5 では 89.6%、pH 6 では 95.1%、pH 7 では 90.8%、pH 8 では 86.1%、水では 92.7%であり中性付近で安定であった。このことから親水性ゲルを用いるイオントフォレーシス製剤でも中性付近が安定と考えられ、pH 5、6 及び水を選択し、3 種類のイオントフォレーシス製剤を試作し 40℃ 3 カ月間の加速安定性試験を行った。その結果 pH 5 では 104.2%、pH 6 では 99.2%、水では 106.1%とほぼ安定であった。また、ゲルの性状にも異常は見られなかった。以上の結果より加速試験では安定性の高いスマトリプタン製剤が試作できた。今回スマトリプタンの含量を 1.6μg としているため今後この安定な pH の製剤を用いて吸収試験を行いスマトリプタンの投与量を決める必要がある。更にその製剤を用いて本安定性(25℃ 3 年)試験を行う必要がある。

【結論】今回の実験により安定性の高いスマトリプタン製剤が作成できた。

【参考文献】　1) イミグランインタビューフォーム、2) 片頭痛へのアプローチ、
3) Steven J.Siegel et al, Pharm. Res., **24**, 1919, 2007，4)分析化学便覧

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-167	氏　名	清水　舞
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	スポットオンタイプのイヌ認知症治療用製剤の有用性評価		

【目的】近年、イヌの寿命が延びていることにより認知症に罹るイヌが増え、昼夜逆転や無駄吠え、飼い主を噛むなどの行為が問題となっている。ヒトの認知症治療には種々の薬剤が使われているが、イヌへの経口投与は難しく、より簡便な投与方法が望まれる。そこで本研究では、イヌ皮膚へ滴下する経皮吸収型液剤（スポットオンタイプ製剤）を開発するため、*in vitro* での透過性の評価および *in vivo* での評価を行う。

【方法】*in vivo* 実験方法

ビーグル犬（約 20 ヶ月齢、雄、体重 11.2~13.5kg、例数 3 匹）に、認知症治療薬の経口投与（生理食塩水に溶解した当該薬物溶液 1.0mg/kg)、経皮投与（5%(w/v), スポットオンタイプ製剤 4ml)、および静脈内投与（i.v. 生理食塩水に溶解した当該薬物溶液 0.1mg/kg）を行った。あらかじめ決められた時間間隔で血液を約 10ml 採取した。得られた血液を遠心分離（4℃, 3000rpm, 15 分）し、上清を採取した。さらに、有機溶媒で前処理した上清を蛍光 HPLC（島津）で分析し、試料中の薬物濃度を測定した。

in vitro 透過実験方法

フランツ型拡散セルに切除したビーグル犬の皮膚を取り付け、真皮層側にレセプター液としてリン酸緩衝生理食塩水を流速 6mL/hr で送液した。角質層側に 200 μL のスポットオンタイプ製剤を滴下し、*in vitro* 皮膚透過実験を行った。フラクションコレクターにより採取したレセプター溶液を UPLC（Waters）で分析し、試料中の薬物濃度を測定した。

【結果・考察】各投与経路における最高血中濃度（Cmax）を表に示した。すでに、認知症のイヌに当該薬物を 0.1mg/kg で経口投与し、認知症の症状が改善したという報告がある[(1)]。本研究での投与量は報告例の 10 倍であり、薬効の得られる Cmax は本研究結果の 1/10（約 1ng/mL 程度）であると仮定した。経皮投与をした場合の Cmax は目標値よりも十分高く、薬効が得られることが示唆された。また、*in vitro* 皮膚透過試験から得られた透過パラメーターと経皮治療システム開発用薬物動態解析ソフトウェア SKIN-CAD™ （バイオコムシステムズ）を用い、*in vivo* 経皮投与時の血中プロファイルをシミュレートした。計算値と実測値は傾向が一致し、*in vitro* 皮膚透過性試験から *in vivo* における血中濃度が予測できることがわかった。*in vitro-in vivo* の相関が得られたことにより、最適な投与間隔、投与量、投与面積の設定を *in vitro* 透過試験とソフトウェアで評価できることが示唆された。

表.各投与経路における最高血中濃度

	経口	経皮	静注
Cmax(ng/ml)	8.02±4.03	12.51±3.73	5.20±0.69

平均値±S.E.　n=3

【結論】本剤の経皮投与で、設定した Cmax より高い血中濃度が得られたことから、本剤の有効性が示唆された。さらに、本剤の用法用量の設定を *in vitro* 透過試験とソフトウェアで評価ができる。

【参考文献】(１)松波典永ら 動物臨床医学会プロシーディング, 339-340, (2009)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-174	氏　名	田中　伸尚
所属研究室	製剤工学研究室		
研究テーマ	塩基性脂溶性薬物を含有した経皮吸収製剤の薬物皮膚透過性評価		

【目的】本研究で用いた薬物は塩基性高脂溶性薬物の統合失調症治療薬である。統合失調症は慢性で進行性且つ非可逆性の疾患である。薬物治療において、統合失調症が慢性疾患であるがゆえに薬物の長期にわたる継続的服用が重要であり、また進行性であるがゆえに早期介入が望ましいとされている。いかに維持治療を続け、再発を繰り返さず、社会性を失わせないようにして行くかが薬物治療において重要であり、そのためにコンプライアンスの維持・向上が治療において重要である。現在上市されている当該薬物は経口剤であるが、これを経皮吸収型製剤とすることができれば患者の服薬コンプライアンスの維持・向上させ、病状を維持できることが期待される。しかし、当該薬物は他の経皮吸収型製剤化された薬物に比べ分子量、脂溶性ともに高いことから、既存の処方に囚われない新規経皮吸収処方を確立する必要がある。本研究では、経皮吸収が困難な塩基性高脂溶性薬物の経皮吸収型製剤の開発を目的として実験を行った。

【方法】添加剤として、高級アルコール、界面活性剤、脂肪酸、溶解剤等の組合せを検討し、当該薬物に適した処方を探索した。処方の一次評価は、サンプル調製後、一晩室温放置して結晶が析出せず動物に供することができる処方という観点で評価を行った。薬物濃度が高く且つ調製後一晩室温放置して結晶が析出しなかった処方ついて *in vitro* 皮膚透過性試験を検討したが、薬物が水に難溶であるため実験系の確立に至らなかった。そこで、*in vivo* で薬物皮膚透過性を評価するため、血漿中からの薬物抽出方法および分析方法の確立を検討した[1,2]。

【結果】49 処方検討し、サンプル調製後一晩室温放置して結晶が析出しなかった 2 処方を得た。結晶が析出しなかった処方は、薬物濃度 15%で脂肪酸と吸収促進剤が組み合わされた処方であった。

In vitro 皮膚透過性試験では、ヘアレスマウスの皮膚を用いて条件検討を行ったが、薬物のリザーバー溶液への溶解性が悪く薬物皮膚透過性を評価することができなかった。人工膜でも検討したが実験系の確立に至らなかったため *in vivo* での薬物透過性を評価することとした。

血漿からの薬物抽出方法についてはジエチルエーテルにより抽出する方法を改良して用いることで血漿サンプル中の薬物濃度を測定できる方法を確立することができた。今後、本抽出方法および確立した分析方法を用いて *in vivo* での薬物皮膚透過性試験を行い、処方検討していく予定である。

【参考文献】

1) *J. Chromatogr. B*, **Vol.867**, 15-19 (2008)

2) *J. Chromatogr. B*, **Vol.821**, 8-14 (2005)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-004	氏　名	安藤　寛
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	青年男子のスポーツと血液レオロジー		

【目的】スポーツと血液レオロジーについては、血液粘度やヘマトクリット値（Ht）についてトップアスリートを対象にした報告が数報報告されているにすぎない。本報告では、青年男子の一般人・トップアスリート・スポーツ愛好家の 3 群について血液粘度・Ht・赤血球変形能等の測定を行い、3 群における血液レオロジー的特性について比較すると共にスポーツの安全性について検討した。

【方法】 （1）被験者：平均年齢 20 代前半の成年男子を 3 群に分類した。A 群：一般人 12 人、B 群：トップアスリート 12 人、C 群：スポーツ愛好家 20 人、計 42 人を対象とした。（2）採血条件：前日禁酒とし早朝空腹時に抗凝固剤として EDTA-2K を用いて行った。（3）測定項目：血液粘度、赤血球変形能。赤血球変形能は、採血後 2 時間以内に 30cm の水圧下で 5μm のミリポアフィルターを全血 0.5ml が通過する時間を測定し、Ht から赤血球が 30 秒間にフィルターを通過する量で表した。（4）統計処理は、t 検定を用い、有意水準は危険率 5%未満とした。（5）本研究を行うに当たって、東京大学・順天堂大学の倫理委員会の承認を得た上で行った。

【結果】（1）全血粘度（$r=37.5sec^{-1}$）：A 群 5.76 mPa/s、B 群 5.89 mPa/s、C 群 7.3 mPa/s であり、A 群と C 群、B 群と C 群で共に有意差($p<0.05$)が認められた。（2）全血粘度（$r=375sec^{-1}$）：A 群 3.95 mPa/s、B 群 3.92 mPa/s、C 群 4.23 mPa/s であり、A 群と C 群、B 群と C 群で共に有意差($p<0.05$)が認められた。（3）Ht：A 群 48.1%、B 群 48.1%、C 群 49.4%であり有意差は認められなかった。（4）Ht45 の血液粘度（$r=37.5sec^{-1}$）：A 群 5.23 mPa/s、B 群 6.09 mPa/s、C 群 6.31 mPa/s、A 群と B 群、A 群と C 群で共に有意差($p<0.0001$)が認められた。（5）Ht45 の血液粘度（$r=375sec^{-1}$）：A 群 3.64 mPa/s、B 群 4.25 mPa/s、C 群 4.38 mPa/s、A 群と B 群、C 群と B 群で共に有意差($p<0.0001$)が認められた。（6）赤血球変形能（ml/30sec）：A 群 0.549 mPa/s、B 群と 0.971 mPa/s、C 群 0.932 mPa/s であり、A 群と B 群で、A 群と C 群で共に有意差($p<0.0001$)が認められた。

【考察】全血粘度（$r=37.5sec^{-1}$・$r=375sec^{-1}$）では共に一般人＜トップアスリート＜スポーツ愛好家であり、スポーツ愛好家の血液粘度が最も高い状態であった。また Ht には有意差は認められなかった。赤血球変形能の結果から有意差は認められなかったが、一般人＜トップアスリート＜スポーツ愛好家の順であった。これらのことから各群での血液粘度の違いは、赤血球変形能の影響があると考えられた。

【結論】一般人・スポーツ愛好家とトップアスリートの血液粘度と赤血球変形能を比較すると、トップアスリートの赤血球変形能は高く、血液粘度は低かった。この結果はスポーツ選手としては好ましい状態と思われた。しかしながらスポーツ愛好家の赤血球変形能は高かったが血液粘度も高く、運動時に心肺機能への負担がトップアスリートに比べ大きい状態であると推測された。このようなスポーツ愛好家に対して、何らかの栄養管理が必要ではないかと考える。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-033	氏　名	直井　隆浩
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	魚油濃縮物摂取による運動能力向上に関する研究		

【目的】魚油濃縮物摂取に関するこれまでの研究により、EPA 摂取が運動選手の持久力を向上することが報告[1)]されている。本報告では、このメカニズムと効果について、一般成人男子を対象に検討を行ったので報告する。

【方法】１．健康な若年成人男性２０名を被験者とし、魚油投与群と非投与群に分け二重盲検方で行った。摂取期間は８週間とした。摂取量は一粒魚油 300mg 含有ソフトカプセル（一日あたり EPA996mg　DHA426mg)、プラセボは一粒中鎖脂肪酸 TG300mg 含有ソフトカプセルをそれぞれ一日１２粒摂取する。２．試験前後において、血液検査ならびに持久能力テストを実施した。血液検査では、生化学検査、血液検査、赤血球膜脂肪酸構成等を測定した。運動能力の測定項目としてブレスバイブレス法により最大酸素摂取量、最大下運動時における酸素摂取量を、血圧に合わせたスケールにより主観的運動強度の聞き取りを行った。統計法は student- t 検定を行い、両側危険率５％を有意とした。なお、本試験は、東京大学、富山大学倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】投与群において血漿中 EPA 濃度（mol%）は 1.24±0.300 から 3.39±0.240 に上がり、アラキドン酸(AA)量との比(EPA/AA)は 0.14 から 0.39 に増加した。また、赤血球膜リン脂質中 EPA 量は、摂取前 1.01mol%から摂取後 2.51mol%に増加し、EPA/AA も 0.08 から 0.22 に増加した。血液検査では、プラセボ群の投与前と後で Ht 値（%）が 49.9±1. 88 から 47.1±1. 61 と有意に低下したこと以外では有意差は認められなかった。主観的運動強度は、投与群では有意差をもって低下した。最大下運動時における酸素摂取量（ml/kg）は、投与群で血中 LA２mM 下では 617.0±33. 1 から 600. 7±26. 6 に低下、血中ＬＡ３mM下では 773.3±37. 5 から 745. 4±28. 9 に低下し、プラセボ群で血中 LA２mM 下では 656.3±30. 1 から 652. 2±25. 8 に低下、血中ＬＡ３mM下では 812.2±29. 7 から 814. 2±28. 5 に上昇した。投与群において、赤血球膜のＥＰＡ濃度と酸素摂取量の相関に有意差がみられた。

【考察・結論】赤血球膜のＥＰＡ濃度は EPA 摂取により血漿中 EPA 量は 2.8 倍に増加し、赤血球膜リン脂質中 EPA 量は 2.5 倍に増加した。また、赤血球膜リン脂質中では 1.3 倍に増加した。Ht 値では有意差があったが、粘度の検査項目には有意差が現れなかった。しかし、ＥＰＡ投与群では酸素摂取量の低下、主観的運動強度の低下に有意差があった。また、赤血球膜のＥＰＡ濃度と酸素摂取量に相関がみられた。これらより、運動選手でない一般成人男性においてＥＰＡの持久力向上のメカニズムは赤血球変形能を上げることにより血液の流動性を良くし、末梢への酸素供給能力の向上による酸素摂取量の低下と、有酸素運動の酸素循環の効率向上による運動能力の向上がみられたと考えられる。

【参考文献】1)KOBAYASHI S, IKUO T, KEISUKE S, TAKAHASHI S, et al. Effect of fish oil ingestion on RBC membrane function of a long-distance runner in high-altitude training. J Lipid Nutrition. 12(1)75-84.2003.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-046	氏　名	山寺　徹
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	地域安全管理ネットワークへの薬学生の関わり		

【目的】平成１９年から医療機関で医薬品安全管理体制が法制化され、医薬品に関する安全対策が義務化された。しかしながら、調剤薬局や診療所などの比較的小規模な施設では対策が十分とは言えないのが現状である。現在、城西国際大学と近隣の薬局・病院をインタネットで結び、各施設で発生したインシデント・アクシデントを収集・分析・改善・対応および共有化することで、より質の高い安全管理を目指している。今回このネットワークに参加し、地域の安全管理に関与したので報告する。

【方法】１）ネットワークに加盟している３医療機関の医薬品の保管状況を確認した。確認項目は、㋑設置されている薬剤の定数㋺期限切れ㋩保管場所の確認㋥別棚に異なる医薬品の有無等

２）ネットワークに加盟している薬局の内８つの薬局に巡回を行い、平均処方箋枚数・薬剤師数・手順書の有無・ヒヤリハット経験有無および研修会参加回数等について調査した。

３）城西国際大学薬学部の安全特論演習を受講している約６０名の５年生を対象にし、Ⅰ・Ⅱ期に実習先の薬局・病院で経験したインシデント・アクシデント事象に対する報告書を回収した。その報告書を、事象・レベル・要因に分類した。そして、ワーストレベルを考え危険度で分類した。（Ⅲ期については、現在集計中であり合わせて報告する。）

【結果】１）医薬品の保管状況については、A 病院では麻薬金庫に麻薬以外の薬剤あり。期限切れについては 19 件。輸液棚に定数以外の物が 17 件。B 病院では、毒薬・劇薬の区別がなされていなかった。開封日記載漏れは１１件。期限切れ薬は１件。C 病院では、劇薬の区別がなされていなかった。開封日記載漏れは５件で消毒薬はすべて記載がなされていなかった。期限切れは５件。

２）巡回した８薬局ではヒヤリハットの全てで経験があり、手順書が存在したが画一的なものであった。研修会に参加していない薬局が半数であった。

３）実務実習での報告書件数は全体で２６件あり、事象では剤形違いと投薬ミス、要因では確認不足と名称類似が最も多かった。また、ワーストストーリーではレベル１が１３件で、死亡に至るレベル 5 が１件であった。

【考察】調査を行った病院での医薬品の保管状況は、インシデント・アクシデントを誘発しうる状態と示唆される。医薬品の保管状況の是正も今後インシデント・アクシデントを軽減する大きな要因になる。また、薬局において研修会に参加することが困難な場合があるため、地域医療安全ネットワークを利用して定期的な情報共有が必要である。今回の報告書の結果から、薬学生が非常に危険なレベルのインシデント・アクシデントを起こす可能性が示唆された。要因は、確認不足と考えられ、薬学生一人ひとりの注意力や集中力が必要になってくる。

【結論】地域安全管理ネットワークに薬学生が関わる事により、薬学生の危機管理能力が養えられると共に、医療機関の医薬品の保管状況確認や薬局への巡回結果を、フィードバックをすることで、地域のより質の高い安全管理体制の構築に寄与できると考えられた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-096	氏　名	吉野　聡美
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	青年男子の魚油濃縮物摂取による血漿中及び赤血球膜リン脂質中の脂肪酸構成の変動		

【目的】現在、コレステロール治療を始めとして、脂質摂取に関する議論が国内外で行われている。これらの議論の中で EPA や DHA を含む魚油摂取が推奨されているが、その摂取量については明確な結論が出ていない。特に若年者については不明な点も多い。そこで今回、20 代前半の成年男子に比較的低用量の魚油濃縮物を摂取させ、血漿中と赤血球膜リン脂質中の脂肪酸構成の変動を測定した。

【方法】被験者として 20 代前半の男子 20 名を、魚油濃縮物（EPA 996mg/day）摂取群とプラセボ(中鎖脂肪酸トリグリセリド)摂取群の 2 群に分け、それぞれ 8 週間摂取させた。試験は二重盲検試験で行った。被験食品摂取前と摂取終了後の早朝空腹時に採血を行い、血漿中と赤血球膜リン脂質中の脂肪酸 21 分画の測定を行った。測定は Bligh&Dyer 法により総脂肪酸を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより総リン脂質分画を分離し、内部標準液として、2-diheptadecanol-sn-glycero-phosphocholin(Avanti Polar Lipids,Inc,ALUSA)を加え、塩酸メタノールによりメチル化後、キャピラリーカラム DB-225 を用いて、ガスクロマトグラフ GC-2014(島津製作所 京都)で行った。昇温プログラムについて GC-solution にてコントロールした。測定結果は、脂肪酸構成比(%)に換算し評価した。なお、本研究は事前に東京大学、富山大学の倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】血漿中 EPA 量は、EPA 摂取群では摂取前 1.24mol%から摂取後 3.39mol%に増加し、アラキドン酸(AA)量との比(EPA/AA)も 0.14 から 0.39 に増加した。赤血球膜リン脂質中 EPA 量は、摂取前 1.01mol%から摂取後 2.51mol%に増加し、EPA/AA も 0.08 から 0.22 に増加した。また、血漿中 n-3 系不飽和脂肪酸量は摂取前 7.49mol%から摂取後 10.23mol%へ、n-6 系不飽和脂肪酸量は摂取前 32.79mol%から摂取後 32.33mol%へ変動し、赤血球膜リン脂質中 n-3 系不飽和脂肪酸量も摂取前 9.05mol%から摂取後 11.72mol%へ、n-6 系不飽和脂肪酸量は摂取前 27.28mol%から摂取後 25.16mol%へと変動が見られた。一方、プラセボ摂取群においては血漿中、赤血球膜リン脂質中ともに有意差は認められなかった。

【考察】今回の試験では、EPA 摂取により血漿中 EPA 量は 2.8 倍に増加し、赤血球膜リン脂質中 EPA 量は 2.5 倍に増加した。また、n-3 系不飽和脂肪酸量は血漿中では 1.4 倍に増加し、赤血球膜リン脂質中では 1.3 倍に増加した。n-6 系不飽和脂肪酸量の変動は血漿中、赤血球膜リン脂質中ともに推計学的な有意差は認められなかった。18～20 歳の成年男子に EPA 1.5g/day を摂取させた報告 [1)]では、赤血球膜リン脂質中 EPA 量が 2.4 倍になり、1.0g 摂取と 1.5g 摂取は同等であった。

【結論】今回の試験では、比較的低用量の EPA を摂取させたが、今後適切な摂取量を設定する上で、摂取量、期間、年齢を考慮した検討が必要と考えられた。

【参考文献】1)KOBAYASHI, S., HAMAZAKI, T., SAWAKI,S., and NAKAMURA, H Reduction in the ADP release from shear-stressed red blood cells by fish oil administration　THROMBOSIS RESEARCH 65;353-364,1992

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-140	氏　名	望月　秀昭
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	ばね緩和法による軟膏類の粘度と降伏値の測定法の検討		

【目的】軟膏類のレオロジー的特性は、その構造上からくる特性・測定条件・個々の軟膏の持つ履歴等により測定値が異なるため評価しづらい。

今回、バネ緩和法の基礎理論を用い、軟膏類の持つレオロジー的特性の一つである降伏値の測定方法について検討したので報告する。

【方法】試料：粘度校正用標準液として J．S 液 100、200，500、1000、2000（昭和シェル石油株式会社）を用い、軟膏として三社の白色ワセリン（白色ワセリン；三晃製薬 Lot５４B、サンホワイト：岩瀬コスファ Lot94025、プロペト：丸石製薬 Lot5113）を用いた。

測定法.バネを粘度計指示値 θ が１００％になるまで巻き上げ、ローターをロック状態後、試料 0.6ｇ を取りコーン内に入れ、ロックを解放後１秒間隔で θ 値を読み取った。

J.S 液の測定には Cone/plate 型粘度形の RE500L（東機産業）を用い、軟膏類の測定には同機種の RE500L を用いた。測定は、２５℃の環境下で行い、J.S 液の測定にはｺｰﾝ４８°、プレートＲ２４を、軟膏類の測定には、コーン３°、プレートＲ１４を用いて行った。軟膏類の測定にあたっては、前処理として考え、ずり履歴の影響を見る目的でサンホワイトにずり負荷量として γ＝3.83、9.575、19.15sec^{-1}を加え検討した。測定手順としては、70 秒間試料にずり負荷を加え、60 秒間静置後測定を開始し、120 秒間１秒間隔で測定値を読み取り、600 秒間静置後再度測定を繰り返した。測定値の解析には Casson の流動方程式$\sqrt{S}=\sqrt{Sc}+\sqrt{\mu c \cdot D}$ (S：ずり応力、Sc：Casson 降伏値、μ ｃ：Casson 粘度、D：ずり速度)、ニュートンの粘度式 $\eta=S/D$ より変形した。$\eta=(\sqrt{Sc}+\sqrt{\mu c \cdot D})^2/D$ を用いた。

なお、Casson 降伏値と平衡粘度を求めるにあたり解析ソフト TOP２B（東機産業）で行った。

【結果】J.S 液を用いた測定では、高粘度になるに従い粘度時計指示値（θ）の低下は遅くなり、指示値（θ）が１％に達する時間は、J．S100 が 12sec，J．S200 が 23sec，J．S500 が 52sec，J．S1000 が 92sec，J．S2000 が 186sec であった。J.S100 は、測定時間が 3～８秒の間で測定誤差が５％以下で、この間のずり速度の最低は 2.28sec^{-1}であった。以下、J.S200 は３～１４秒で 1.02sec^{-1}，J.S500 は 4～24 で 0.75sec^{-1}，J.S1000 は７～３６秒で 0.61sec^{-1}，J.S2000 は 10～40 秒で 0.27sec^{-1}であった。

【考察】サンホワイトに一定のずり履歴を与えたところ、５ｒｐｍ(19.15 sec^{-1})が最も再現性が良かった。軟膏類は製造工程、過去の取り扱い方法等により、多くの異なったずり履歴を受けており、そのずり履歴のため同一の軟膏でもその物性は異なると考えられる。

軟膏の物性を再現性良く現す手段として軟膏に一定のずり履歴を負荷することにより再現性の良い結果が得られた。

【結論】三種類の白色ワセリンでもそれぞれが特有の物性を持っており、これらの物性の違いは軟膏の塗布面への付着力や主薬の溶出等への影響が考えられ、今後これらへの影響について更に検討することにより本方法が品質管理面等への応用も期待された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-184	氏　名	松永　惇佑
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	入院患者の転倒・転落時の睡眠薬服用調査		

【目的】ヒヤリハット事例の内、転倒・転落は全体の約 16%であると報告されており[1)]、転倒・転落は時として骨折や回復遅延等、重大な事象につながることがある。
転倒・転落の要因の一つとして睡眠薬の関与が考えられることから、インシデント・アクシデントレポートを用いて、入院時の転倒・転落時の睡眠薬服用調査を実施したので報告する。

【方法】１、調査対象：T 大学病院の 2006 年 4 月 1 日から 2006 年 6 月 30 日の三カ月間の間で、転倒・転落時に睡眠薬を服用していたかどうかの事例を対象とする。
２、集計項目：睡眠薬使用の有無、睡眠薬の種類と件数、年齢、性別、どのような状態で転倒・転落を起こしたか、レベルの分類[2)]（0：エラーや医薬品・医療用具の不具合が見られたが患者に実施されなかった、1：患者への実害はなかった、2：処置や治療は行わなかった、3a：簡単な処置や治療を要した、3b：濃厚な処置や治療を要した)、ワーストシナリオ（3a、3b で分類)、睡眠薬服用の併用パターン、睡眠薬服用から転倒までの日数について集計した。

【結果】転倒・転落を起こした患者は 143 人、性別は男性 91 人、女性 51 人であった。その中で睡眠薬使用患者は 60 人(42%)であり、比率は男性 36 人(40%)女性 24 人（47%）であった。年齢は、全体と睡眠薬服用患者両方ともに 70 代にピークがみられ、報告書レベルの分類ではレベル 2 が 46%､次いでレベル 1 が 43%であった｡ワーストシナリオは 3a が 13%、3b が 86%、不明が 1%であり、転倒転落時刻は、全体では深夜 1 時～2 時、6 時～7 時、12 時、20 時～21 時にピークが見られたのに対し、睡眠薬服用患者では 5 時～6 時、20 時にピークが見られた。転倒・転落を起こした際の睡眠薬は、レンドルミンが 25 件、マイスリー19 件と全体の 74%であった。睡眠薬服用の併用パターンは単剤 72%、多剤併用 28%であり、睡眠薬服用から転倒までの日数は一週間以上が 58%と一番多く、事象の分類では患者が一人での動作中が 80%と一番多かった。

【考察】医療現場では一般的に入院時に入院患者の査定を行い、転倒・転落に対しての防止策(睡眠薬に関しては安易な使用と、薬剤減量、薬剤変更、眠剤服用前にトイレに行ってもらうこと、他の防止対策については、転倒・転落の危険性について患者・家族に説明する、離床センサーの使用、履物の変更等)が行われている。

今回の調査結果から、睡眠薬服用から転倒までの日数は、一週間以上が最も多く、発生時は 1 時～2 時、6 時～7 時、12 時、20 時～21 時に多くみられ、また患者一人での動作時が 80%と多いことから、これらを加見した対策が望ましいと考えた。

【結論】今回の調査結果を従来の査定に加えることで、より一層の転倒・転落防止対策が得られると考えた。

【参考文献】１）厚生労働科学研究「医療のリスクマネジメントシステム構築に関する研究」、２）医療事故防止マニュアルより抜粋。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-205	氏　名	新見　裕子
所属研究室	医療安全学研究室		
研究テーマ	医薬品の副作用早期発見に向けての薬剤師のかかわり ―フェノバルビタールに起因する SJS の発症―		

研究概要

【目的】スティーブンス・ジョンソン症候群[皮膚粘膜眼症候群：Stevens-Johnson syndrome（以下 SJS と略す）]の発生頻度は極めて低いが、発症した場合予後不良で、患者の 1/5 が死亡していたとの報告[1)] がある。原因薬剤は多数あり、投与後の副作用早期発見は薬剤師の重要な役割とされている。今回、フェノバルビタールにより SJS を発症した患者の症例から、早期発見に向けての薬剤師のかかわりについて検討した。

【方法】フェノバールにより SJS を発症した国内の症例（27 例）から患者背景を集計した。また、SJS を発症した３名の患者が入院していた医療機関のフェノバルビタールの使用状況、3 名の患者の発症までの経緯を電子カルテ・インシデントレポート等から集計した。

【結果】フェノバールにより SJS を発症した患者の性別・年齢に有意差（年齢：$p < 0.1069$）は認められなかった。しかし、発症時期は５月から７月に多い傾向（$p < 0.0735$）がみられた。また、発症地域は関東が多く、地域別の有意差（$p < 0.0001$）が認められた。SJS を発症した３名の患者が入院していた医療機関のフェノバールの剤形別使用者では錠剤が多く、全体の約６割を占めた。またフェノバールの総投与量のうち 9 割は錠剤として投与されていた。 ３名の SJS 患者は原因薬剤投与後 18 日から 31 日に皮膚病変、粘膜病変が現れていた。

【考察】SJS 患者の性別、年齢に差が認められなかったことから性ホルモンや代謝機能は発症に関与していないと考えられる。発症時期が５月から７月に多いことから湿度が高い時期に発症しやすいと考えられる。また、関東に患者が多い要因として人口、病院が多いことだけでなく、副作用報告に対する意識が高いことが考えられる。調査した医療機関の SJS 発症率は 0.68%であり、錠剤使用者での発症率は 1.18%であった。錠剤の使用者数が多いため錠剤の発症率が高くなると考えられる。また、発症者 1 人の総投与量は 2.61～3.84ｇであり少量の投与で発症している。SJS の初期症状については発熱、粘膜病変、皮膚病変とされている。しかし今回の症例では発熱がみられたのは１例であり、フェノバールによる SJS では発熱は現れにくいことが推測された。SJS は原因と考えられる医薬品の服用後 2 週間以内に発症することが多いとされているが、３例とも 2 週間以上経過してから発症していた。

【結論】今回の調査から薬剤師が SJS の初期症状を把握することは非常に難しく、今後、更なる症例をつみ重ねる必要があると考えられた。

【参考文献】１）Roujeau, J-C., et al.：Medication Use and The Risk of Stevens-Johnson Syndrome or Toxic Epidermal Necrolysis, N. Engl. J. Med., 333：1600-1607（1995）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-085	氏　名	新山　佳惟
所属研究室	医薬品情報学研究室		
研究テーマ	先発医薬品と後発医薬品について公表されている医薬品情報の調査		

【目的】後発医薬品（以下、後発品）は、規格および試験方法、安定性試験および生物学的同等性試験により審査され、先発医薬品（以下、先発品）と品質・有効性・安全性が同等であるとして製造販売が承認される。医療費高騰の中、後発品は先発品より薬価が安く設定されていることから、医療費の削減や患者負担の軽減に貢献すると考えられ、その使用促進が推進されている。しかし、本邦における平成 21 年度の後発品の数量シェアは 20.2%（金額ベース 8.5%）であり、欧米諸国と比較すると普及が進んでいない。その背景として医療関係者において後発品に対する製剤自体の品質、医薬品情報の量や質、安定供給についての不安が払拭されていない状況が挙げられる。そこで本研究では、医薬品情報の提供状況に着目し、先発品および後発品の製造販売企業ホームページ（以下、企業 HP）で公表されている情報について検討した。

【方法】平成 22 年 1 月に「劇薬」の指定が解除されたロキソプロフェンナトリウム水和物錠剤（以下、LP）を取りあげ、上市されている 24 製品を対象とした。企業 HP の医療関係者向けサイトにおいて公表されている LP に関する情報について調査した。続いて、情報が公表されている場合は 1 点、資料請求が必要な場合は 0.5 点、公表されていない場合は 0 点としてスコア化した。

【結果】企業 HP を作成していない後発品製造販売企業が 1 社存在した。添付文書、医薬品インタビューフォーム（以下、IF)、製剤写真、包装変更等の改定情報については、ほとんどの後発品企業が公表していた。しかし、平成 23 年 4 月現在「劇薬」の指定解除に伴う表示変更が IF に反映されていない企業が 3 社存在した。また、後発品企業は長期安定性試験や無包装状態での安定性試験（以下、無包装試験)、副作用報告の情報を公表していない場合が多かった。各後発品の公表情報を比較したところ、承認に必要な生物学的同等性試験、溶出試験、加速試験の情報および先発品との比較情報や改定情報については大きな差は見られなかった。後発品間の比較では、簡易懸濁法の適否、錠剤粉砕時の安定性、副作用報告のような企業努力により得られる情報には差がみられた。各情報について、問い合わせにより提供する旨を表記している企業は 2 社のみであった。各後発品のスコア（スコア化対象情報項目数:21）では 0/21(0%)～18/21(85.7%)と大きな差がみられた。また、ある同一薬価の後発品スコアは、0/21(0%)～17/21(80.9%)であった。

【考察】企業 HP 上の情報は、利便性が高いにも関わらず、後発品では先発品に比して、副作用報告、長期試験や無包装試験等の安定性についての情報を公表していない場合が多く、「劇薬」指定が解除されていない IF を提供している製品もみられたことから、情報提供体制に問題があると考えられる後発品企業の存在が明らかになった。各情報について医療関係者からの依頼に応じて提供する旨を表記している企業は 2 社のみであったが、この表記も必要と考えられた。後発品の薬価は算定基準によって決められることから、医薬品情報提供が反映されるわけではない。しかし、医薬品は安定性や有効性・安全性に関する情報が付加されてはじめて医薬品たり得るものであり、情報提供の役割を十分に果たしていない後発品企業には改善勧告も必要と考えられた。後発品に関しても医療現場で必要とされる情報提供が実施されることで、より一層の普及が進むと考えられた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-149	氏　名	石井　元絵
所属研究室	医薬品情報学研究室		
研究テーマ	一般人におけるセルフメディケーションに関する意識調査		

【背景・目的】平成 22 年 10 月現在総務省が発表した本邦における 65 歳以上人口の割合は 23.1%であり、本格的な高齢化社会に突入している。それに伴い、平成 18 年度の国民医療費は 33 兆円を超えており、厚労省の医療費推計によると平成 37 年には国民医療費は 48 兆円に達すると予測されている。一方、自分自身の健康に関心が高い国民が増え、「セルフメディケーション」の考え方が注目されるようになってきた。セルフメディケーションの実施により、年々増加する医療費を抑制することが期待されることから、医療関係者の間ではその啓発のための働きかけが行われている。このような背景の下に、平成 21 年 6 月施行の改正薬事法により OTC 医薬品のリスクの程度に応じた分類や情報提供がなされることとなった。そこで本研究では、一般消費者を対象とした調査を行い、改正薬事法施行後におけるセルフメディケーションの実態を明らかにすることを目的とした。

【方法】今回は、「テニスをしている」という日常的に体を動かしていて健康に関心が高いと推察される集団を対象として、セルフメディケーションに関するアンケート調査を行った。期間は 1 週間とし、南市川テニスガーデンにおいて、施設利用者に対して無作為に 100 枚のアンケート用紙を配布した。

【結果】アンケート回収率は 90.0%であった。回答者の平均年代は 29.8 代、男性が 75.6%、女性が 24.4%であった。「あなたは軽い病気やけが、または具合が少し悪いときに、まずご自分で OTC 医薬品を飲んだり使ったりして治すようにしていますか？」という質問に対し、71 名（78.9%）が「はい」と回答した。OTC 医薬品の使用頻度は「たまに何回か使っている」が 51.1%であった。使用している OTC 医薬品はかぜ薬が最も多く、次いで目薬、解熱・鎮痛薬の順であった。医薬品の選択基準では、「薬剤師などの専門家（薬局・薬店で）に相談する」、「値段」との回答が多かった。服用（使用）期間は「2，3 日」が 40.5%、次いで「1 週間ぐらい」が 27.0%であった。「添付文書を読んでいる」との回答は 43.2%にすぎず、「薬理作用」や「保管および取扱い上の注意」などの記載を読んでいるとの回答は少なかった。「健康のために栄養ドリンク、健康食品やサプリメントを購入して摂取していますか？」との質問に対し、44 名（48.9%）が「はい」と回答した。そのうち OTC 医薬品によるセルフメディケーションを実施していると回答した割合は 79.5%、実施していないは 20.5%であった。

【考察】回答者の約 80%がまず OTC 医薬品を使用して症状改善に努めるようにしており、平均年代が約 30 代と比較的若かったためかその割合に年代による差はみられず、調査対象のセルフメディケーションに対する関心は高いと考えられた。OTC 医薬品により症状の改善がみられなかった場合、短期間の使用で医療機関を受診する人が多いことが示され、セルフメディケーションの意義を理解している回答者が多いと考えられた。OTC 医薬品の選択に関して、専門家に相談した結果のみで選ぶとの回答は少なかったことから、専門家によるアドバイスの有用性や問題点について調査する必要性が示唆された。今後、薬剤師は消費者に対し適切な OTC 医薬品や健康食品・サプリメントを推奨することはもとより、積極的に適切な使用方法や製品に応じて保管上の注意などを説明する必要があると考えられた。消費者に対してこれらの働きかけをすることにより、薬剤師は適切なセルフメディケーションのさらなる推進に寄与することが期待されている。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-177	氏　名	中島　淳太
所属研究室	医薬品情報学研究室		
研究テーマ	製薬企業ホームページのアクセス制限やコンテンツに関する調査		

【目的】医薬品情報を検索収集する一つの手段としてインターネットを利用する方法がある。インターネット上には医薬品に関する有用なサイトが多数存在し、多種多様な情報を得ることができる。病院・薬局においても DI ニュースの作成や患者様、および他の医療関係者への情報提供のためにインターネットを利用して医薬品情報を収集する場合は多い。

インターネット上には多くの製薬企業が自社のホームページ（以下、HP）を開設し、自社製品を始め、様々な医療に関する情報を提供している。製薬企業 HP の医療関係者向け情報は医薬品の適正使用に資する意味で有用である。しかし、薬剤師業務に役立つ情報が多いにもかかわらず、これらの情報は製薬企業の HP にて会員登録制サイト上で提供され、パスワード等でアクセスを制限している企業も見受けられる。

本研究では、薬剤師の情報収集に利便性の高い製薬企業 HP の要件を検討するために、HP に掲載されている製品一覧表や医薬品インタビューフォーム（以下、IF）からの目的情報収集における操作性、会員制サイトに掲載されている薬剤師が適切な薬物治療を行う上で有用な情報について調査した。

【方法】2000 社を超える日本国内の製薬企業の中から、日本最大級の医療関係者専門サイトである m3.com (URL http://www.m3.com/) の提携企業 43 社の HP を対象とした。

まず、各製薬企業 HP の操作性および製品一覧表に掲載されている情報について調査した。続いて、会員制サイトに掲載されているコンテンツについて調査した。

【結果】各製薬企業 HP の操作性を調査した結果、まず医療関係者サイトにアクセスする際に職種を選択させる企業は 43 社中 5 社 (11.6%) に上った。会員制コンテンツが 1 つ以上ある企業は 22 社 (51.2%) であった。IF のしおり（目次）の有無について、各企業の製品の中から任意に 10 品目を抽出して調べたところ、10 品目すべてにしおりが付いていたのは 27 社 (62.8%)、次に多かったのは 9 品目で 6 社 (14%) であった。IF にしおりが全く付いていない企業が 1 社 (2.3%) 存在した（その企業が販売している製品数は 9 品目であった）。37 社 (86.0%) の製品サイトに製品一覧表が設けられていた。しかし、製品一覧表を備えていない企業も独自の一覧表を作成しており、目的とする製品情報の検索に手間と時間を要することはなかった。また、目的とする医薬品を容易に見つけることができるよう、製品一覧表中に商品名ロゴを掲載している企業もあった。製品一覧表に掲載されている情報で最も多くみられたのは添付文書、IF、製品写真、くすりのしおり、取扱説明書、包装変更等のお知らせ文書、患者向け医薬品ガイド、薬価基準収載情報、各種コード一覧、備考の 10 項目であった。一方、一覧表に掲載されている情報項目数が最も少なかった企業は 4 項目であり、添付文書、IF、くすりのしおり、製品写真以外の情報は提供されていなかった。HP のトップページから掲載されている添付文書にたどりつくまでの必要クリック数を調査した結果、最も少なかったのは 3 クリックで、4 社 (9.3%)、その次に少なかったのは 4 クリックで、22 社 (51.2%) であった。一方、最も多かったのは 6 クリックで 3 社 (7.0%) であった。会員制コンテンツはその内容により、麻薬製品、薬物治療関連、疾患情報、服薬説明関連、自社製品の詳細情報、その他に分類できた。麻薬製品情報については、全ての企業でアクセス制限がかけられていた。

【考察】IF には基本的にしおりを付けるのが望ましいと考えられた。IF はページ数が多く、しおりが付いていない場合、目的の情報へたどり着くまでにかなりの時間を要する可能性が高い。添付文書にたどりつくまでに必要なクリック数は、できれば 3 または 4 クリックが望ましいと考えられた。また、HP の会員制コンテンツには有用なものが多いことが分かった。麻薬製品は薬事法および麻向法の医薬品等適正広告基準に従い、医療関係者向け情報として制限を設けて掲載されるのは当然である。一方、アクセス制限なしに有用なコンテンツを掲載している企業も数多く見られたことから、麻薬製品を除いて会員制コンテンツのアクセス制限を撤廃することにより、企業 HP の情報収集ツールとしての有用性はさらに高まると考えられた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-197	氏　名	金子　明日香
所属研究室	医薬品情報学研究室		
研究テーマ	妊婦への投与に関する医薬品情報の調査		

【目的】医師や薬剤師が妊婦に対する薬物療法の安全性を考慮する際の根拠となる公的文書として、添付文書が挙げられる。本邦では添付文書上の「妊婦、産婦、授乳婦等への投与の項」において、疫学的調査などで得られる情報に基づき、妊婦等への投与時に必要な情報は記載されているが、リスクカテゴリー等は設けられておらず、最適な薬物療法を行なうための情報としては不十分との声も散見される。本研究では、本邦の添付文書における妊婦等への投与に関する医薬品情報と FDA 薬剤胎児危険度分類基準（以下、FDA 分類基準）で位置づけられたリスクカテゴリーの比較を試みた。

【方法】降圧薬（Ca 拮抗薬、ARB、ACE 阻害薬、β遮断薬、サイアザイド系利尿薬など）（79 品目）、抗菌薬（120 品目）、骨・Ca 代謝薬（20 品目）、糖尿病用薬（27 品目）を対象として、妊婦等への投与に関する添付文書情報を調査した。続いて、これらの医薬品が FDA 分類基準のどのカテゴリーに位置づけられているかを調査した。

【結果】今回調査した医薬品 246 品目中、91 品目が本邦では妊婦等への投与が禁忌であったが、それらに FDA 分類基準のカテゴリーX（禁忌）に位置づけられているものは存在しなかった。禁忌の降圧薬 52 品目のうち 33 品目は、FDA 分類基準ではカテゴリーB、C、D であり、カテゴリーC とされているものが最も多かった。禁忌の抗菌薬 17 品目のうち、FDA 分類基準に収載されている 8 品目は全てカテゴリーC に位置づけられていた。禁忌の骨・Ca 代謝薬 7 品目のうちカテゴリーC は 2 品目、D は 1 品目、そして禁忌の糖尿病用薬 15 品目のうち、カテゴリーB は 5 品目、C は 7 品目であった。さらに、FDA 分類基準においてカテゴリーC もしくは D と位置づけられ、本邦では禁忌ではない医薬品について、それぞれの添付文書の記載について調査したところ、抗菌薬（19 品目）と降圧薬（16 品目）は、有益性投与とされており、「動物実験、臨床使用経験、疫学的調査等で得られている情報に基づく必要な事項」が記載、または「妊娠中に使用した経験がないか又は不十分」と記載されていた。骨・Ca 代謝薬 2 品目と糖尿病用薬 4 品目については、「妊娠中に使用した経験がないか又は不十分」と記載されており、有益性投与となっていた。

【考察】本邦で禁忌とされている医薬品と FDA 分類基準のカテゴリーX は必ずしも一致しないことが明らかとなった。また、FDA ではカテゴリーD に位置づけられている医薬品についても、本邦の添付文書では有益性投与と記載されているだけなど、具体的な情報の記載が不十分との問題が示された。現在、FDA はカテゴリー分類だけではなく、文章による記述でリスク等も表記する形式へと見直されている。FDA 分類基準のように催奇形性の危険度により階層化された評価基準は、薬剤師などが妊婦に対する最適な薬物療法を選択するための根拠となる情報として有用性が高いと考えられ、本邦の添付文書においても、カテゴリーA、B に該当するリスクカテゴリー設置を検討する余地があると考えられた。しかし、妊婦への医薬品投与に際しては危険度評価基準のみで判断せずに、エビデンスの高い情報を収集し、吟味、評価することが重要であろう。

【参考文献】Briggs GG, et al., Drugs in Pregnancy and Lactation 8th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2008)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-002	氏　名	阿久津　彩
所属研究室	物理製剤学研究室		
研究テーマ	美白成分含有リポソーム調整における Bangham 法と超臨界二酸化炭素逆相蒸発法との比較		

【目的】リポソームは内水相に水溶性物質を、リポソームを形成するリン脂質二分子膜中に脂溶性物質を封入することができる。リポソームに封入された物質の細胞内への取り込みには、エンドサイトーシス経路や細胞膜とリポソーム膜との膜融合などの導入経路があるが、その導入効率はリポソーム径やラメラ構造などのリン脂質二分子膜の構造などに大きく依存している。リポソームの調製方法として、一般的には有機溶媒をエバポレーションさせて調製する Bangham 法が用いられている。一方、阿部らは、有機溶媒の代わりに超臨界二酸化炭素を用いる超臨界逆相エバポレーション法を開発した [1)]。Bangham 法の利点は、簡便で特別な機械を要しないこと、ゲル濾過等によって粒子径をそろえられること、small unilamellar vesicle(SUV)を調製できることなどである。一方、超臨界逆相エバポレーション法の利点は、有機溶媒を用いない方法であるため残留溶媒を懸念する必要がないこと、超臨界二酸化炭素が低い臨界温度(T_c=31℃)と低い圧力(P_c=73.8 barr)を有し、無毒性、不燃性で安価であること、large unilamellar vesicle(LUV)を調製できることなどである。本研究では、美白成分である Ai Luros を送達するために最適なリポソームの調製方法について、Bangham 法と超臨界逆相エバポレーション法の比較を行った。

【方法】超臨界逆相エバポレーション法あるいは Bangham 法で調製されたリポソームについて、メラノーマ細胞からのメラニン産生抑制効果を調べることでリポソーム調製方法としていずれの方法が最適か評価を行った。Bangham 法で調製したリポソームは、リポソーム調製後、ゲル濾過により粒子径をそ揃えたものを実験に供した。

【結果】Bangham 法で調製したリポソームは最大で５７％のメラニン産生抑制効果を示した。一方、超臨界逆相エバポレーション法では最大２３．４％のメラニン産生抑制効果を示し、Bangham 法で調製したリポソームの方が強いメラニン産生抑制効果を示すことが明らかとなった。

【考察】今回の結果から、Bangham 法で調製したリポソームにおいて、強いメラニン産生抑制効果が認められた。リポソームに内包した物質の細胞内への移行経路は、大きく分けて 2 種類ある。一つはエンドサイトーシス経路であり、もう一つは細胞膜とリポソーム膜との膜融合である。本研究では、同じ脂質組成でリポソームを調製しており、調製方法の違いによる効果発現の違いは、エンドサイトーシス経路に依存するものと考えられる。Bangham 法では SUV でリポソームが調製できることが大きな特徴であることから、今後、超臨界逆相エバポレーション法あるいは Bangham 法で調製したリポソームの粒子径を調べ、効果との相関を明らかにする予定である。

【参考文献】

Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method *Langmuir* 2006,**22**,2543-2550

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-039	氏　名	藤田　真穂
所属研究室	物理学研究室		
研究テーマ	アンケートに基づく小児用坐剤改良の研究		

【目的】長期実務実習期間中に、実際の患者・医療機関での薬剤の使用方法と製薬企業が指定している正規の使用方法が異なっているという事実を知った。そのため適正な使用法を守りつつ、より患者側に立った製剤の提案ができないかと考えた。

そこで、患者の実際の使用方法を調査する為、種々薬剤の使用に関するアンケートを実施した。そのアンケートから得られた患者またはその保護者が考えるいくつかの問題点について検討を行った。結果、坐剤について分割投与時に問題があることを見出し、それを改善した製剤の試作を行った。

【方法】アンケート：調剤薬局に来局した患者保護者 72 人（患者年齢 5 ヶ月～10 歳）に種々薬剤の使用に関するアンケートを実施した。その結果を基に、さらに調剤薬局に来局した患者保護者 50 人（患者年齢 11 ヶ月～16 歳）に坐剤ついてのアンケートを実施した。

坐剤の調製試験：飽和脂肪酸のグリセリン混合物（ホスコH®）を基剤として調製し（一層坐剤）、質量偏差試験を行った。さらにこの坐剤を二分割し、質量偏差試験を行った。また、融点の異なる２種の基剤（ホスコＥＲ®、ホスコＳＲ®）を用いて二度に分けて添加・冷却を繰り返し２層構造の坐剤を作成し、一層坐剤と同様に質量偏差試験を行った。

【結果・考察】種々薬剤の使用に関するアンケートから小児用坐剤の使用についての不安を感じている事が分かった。これは、投与量が体重や年齢などに応じて決定されるため、分割投与する必要があり、分割投与は患者の保護者が切断する事が多い為であった。坐剤の分割に関するアンケートでは、多くの保護者は切断しての使用経験があり、分割時の方向や切断方法は様々で保護者は分割時に正確な量が投与できているのか不安に感じていた。より正確な分割字の投与と簡便さを視野に入れた製剤の改良が必要であると思われた。そこで、通常の坐剤（一層坐剤）を調製し、分割前後での質量偏差を調べた。その結果分割前は質量偏差試験に適合していたにもかかわらず、分割後は適合していなかった。即ち、臨床で用いられている坐剤を分割すると一定量が投与ができていない可能性が示唆された。次に正確に半分に分割できる坐剤（二層坐剤）を調製し同様の試験を行った。その結果、分割前の質量偏差は一層坐剤に比べ大きかったものの、適合範囲内であった。また、分割後もほぼ完全に二分割されており二分割後も質量偏差試験に適合していた。

【考察】今回の結果から、基剤に主薬を含有させた坐剤を用いれば薬剤師が色の異なる部分で切断するよう服薬指導を行った際、切断する患者や保護者らが同じ位置で切断することができる。これにより医師の希望する正確な用量での使用が可能になると考えられた。

【結論】アンケート結果から分割時の方向や切断方法は様々で患者または保護者は分割時に正確な量が投与できているのか不安に感じていた。坐剤を二分割した結果、分割前の坐剤では質量偏差試験に適合していたにもかかわらず、分割後の坐剤では不適であった。分割使用時には投与量が一定でないことが示唆された。それを改良した小児用坐剤の試作に成功した。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-051	氏　名	荒渡　萌
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	美白成分 Resveratrol 含有リポソーム製剤の毒性評価		

【目的】Resveratrol（*trans*-3,5-4'-trihydroxystilbene）は、ブドウやベリー、ピーナッツなどの植物中に含まれる polyphenolic phytoalexin である。Cadenas と Barja は、Resveratrol がビタミン E やビタミン C よりも強い抗酸化作用を示すことを報告した。美白作用には、すでに色素沈着した皮膚症状を改善する作用とメラニンの産生を抑制し色素沈着を抑える作用の二つの意味があり、Resveratrol は Resveratrol 自身が酸化されることによってチロシナーゼの活性を阻害しメラニンの産生を抑制することで美白効果を示すことが報告されている [1)]。しかし、Resveratrol は水に難溶であるため乳液などの水性製剤に高用量を含有させることが困難であること、*in vitro* の実験において細胞毒性を示すことが報告されている。Caddeo らは Resveratrol をリポソームに内包させることで、水への溶解性を向上させ、リポソームに内包していていない Resveratrol に比べて紫外線による細胞障害をより強く抑制できることを報告した。そこで、本研究では有機溶媒を用いることなくリポソームを調製することができる超臨界二酸化炭素を用いた逆相蒸発法により調製したリポソームを用いて *in vitro* における毒性を調べ、Resveratrol 含有リポソーム製剤の有用性評価を行った。さらに、Resveratrol 含有リポソームの効果を評価するため *in vitro* 実験系の確立を行った。

【方法】B16 メラノーマ細胞に対する Resveratrol 含有リポソームの毒性を、MTS アッセイにより評価した。さらに、Resveratrol 含有リポソームの効果を確認するため、B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制実験系の確立を行った。

【結果】MTS アッセイの結果、Resveratrol をリポソームに内包させることで細胞毒性を抑制できることが分かった。Resveratrol 含量 2wt/v%, 10wt/v%, 20wt/v%の計 3 種のリポソームを調製したが、いずれのリポソームにおいても実験を行った添加量では毒性が認められなかった。さらに、Resveratrol 含有リポソームの効果を確認するため、メラニン産生抑制実験系の確立を行った。Resveratrol 含量、培養条件等を検討した結果、Resveratrol 含量 10w/v%リポソームを用い、本溶液を添加し 48 時間後に細胞からのメラニン産生量を測定する実験系が最も評価に適していることを見出した。

【考察】今回の検討から、Resveratrol をリポソームに内包させることによって細胞毒性を低減した高用量の溶液を調製することができることが明らかとなった。今回の検討では、脂質にジホスファチジルコリン(DPPC)を用いたリポソームのみを検討したが、今後、脂質成分を変えてより導入効率の高いリポソーム製剤の検討及びリポソーム製剤の皮膚透過性を検討する予定である。

【参考文献】

1) P.BERNARD and J.-Y.BERTHON
Greentech S.A.,Biopole Clermont Limagne,63360 Saint Beauzire Cedex.France
Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition International Journal of Cosmetic Science.22 219-226(2000)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-052	氏　名	池澤　直樹
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	免疫抑制ワクチンの経皮投与の可能性評価に関する研究		

【目的】抗ヒストン H1 抗体が臓器移植時に生じる拒絶反応を抑制することが知られ[1)]、本学では抗ヒストン H1 抗体のミメティックエピトープ(分子量:1105, 以下 SSV)を創製し、これを免疫抑制ワクチンとして投与し、免疫寛容を誘導することを報告している[2)]。SSV または SSV にキャリアタンパクとして keyhole Limpet Hemocyanin(分子量:約 500 万, 以下 KLH)を結合させた KLH-SSV を免疫抑制ワクチンとして、イオントフォレーシス(IPS:iontophoresis)、 マイクロエマルションとマイクロニードルとエレクトロポレーション(MENEP:micro emulsion micro needle electroporation)を併用した経皮ワクチンとしての可能性について評価した[3)]。

【方法】<IPS>

製剤：陽極に銀箔、陰極に銀/塩化銀箔を用い電極を作成(有効面積 3.14cm²)し、これに不織布を重ね、SSV 水溶液または KLH-SSV 溶液(いずれも濃度 650 μg/ml)を 200 μL 添加し、陽極、陰極製剤とした。投与・測定：バリカンとクリームで除毛したマウスの腹部および背部の皮膚に陽陰製剤を貼付し、直流電流装置から 0.314 mA, 0.628 mA, 1.570mA を 30 分間通電し投与を行った。これを 2 週間ごとに計 5 回繰り返した。陽性コントロールとして、KLH-SSV をアジュバンドと共に腹腔内投与(I.P 群)した。2 週間ごとに尾静脈より採血し、血清中の抗 SSV 抗体を ELISA 法により測定した。

<MENEP>

製剤:ジグリセリンモノエステル 1.00g、スルホコハク酸アニオン活性剤 1.42g、中鎖脂肪酸トリグリセライド 17.62g で調製した混液 1mL に対して KLH-SSV50 μL を添加し製剤をマイクロエマルション化した。電極は長さ 0.7mm のマイクロニードルを 9 本有する電極を作成し、隣り合うニードルが陽陰極対局となるように 5 本を陽極、4 本を陰極として電極を作成した。投与・測定：バリカンとクリームで除毛したマウスにマイクロニードル電極を用いて 150V, 50Sec ごとに 10 回通電し、KLH-SSV を 50 μL 加え 50mSec ごとに 150V の電流で 10 回通電した。2 週間ごとに尾静脈より採血し、血清中の抗 SSV 抗体を ELISA 法により測定した。

【結果：考察】I.P 群は 2 週間目から、KLH-SSV を IPS により投与した全ての群では 4 週目から抗 SSV 抗体の産生を確認したが、IPS により SSV を投与した群や MENEP では抗体の産生は見られなかった。一般に IPS を用いたとしても分子量数千から数万の物質が経皮的に伝達できる限界といわれているが、今回の検討により分子量 500 万の KLH-SSV を皮膚に適用し IPS によって電流を負荷することにより抗体を産生することができた。

【結論】IPS を用いた投与においてアジュバンドを併用しなくても抗体の発現を認めたことから、IPS を利用した高分子化合物の皮膚適用型製剤としての可能性が示唆された。

【参考文献】
1) T.Nakamura et.al,. Transplantation, **77**,10,1595, 2004
2) Kuei-chen et.al,. J Immunol., **182**, 4283, 2009
3) 池澤直樹,日本薬学会第 131 年会要旨集 2011, **4**, pp.168

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-056	氏　名	宇田　見帆
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	美白成分 AiLuros 含有リポソーム製剤のメラニン産生抑制効果に関する研究		

【目的】超高齢社会に高速到達し社会的にも問題として注目されているが、患者に対してはもとより健康な人に対しても QOL の向上は重要な研究課題であり、この点において医薬品開発と化粧品開発は密接に関連しているものと言える。シミやソバカスなどの皮膚症状は、メラニンが長期にわたって蓄積された結果生じるものであり、原因となるメラニンの産生を抑制するための様々な美白成分が検討、商品化されてきた。現在報告されている主な美白成分の作用メカニズムとしては、①メラノサイトに直接作用してメラニン生成を抑える。②メラニン生成を活性化させるメラノサイト刺激物質を阻害しメラニン生成を抑える。③生成されたメラニンに対して排出促進・メラニン色素を淡色化する。の三通りである。Ai Luros は上記①.②.の効果があるといわれており、この両作用を有する美白成分としては本邦では Ai Luros だけである [1)]。佐藤、後藤らは、このような Ai Luros の美白効果に着目し、モルモットを用いた美白効果に関する検討を行ったところ、コントロール群に比べ有意な美白効果が認められ、化粧品メーカーとの共同開発により Ai Luros 含有美白化粧品として共立アイシリーズ®が発売されるに至った。一方、リポソームは生体膜と同じ二重層構造の脂質膜を有する内水相の小胞体である。リポソームを用いる利点としては、膜融合により内包された物質を細胞の中に運ぶことが出来きることの他、大きさや脂質組成を容易に調節でき、水溶性物、脂溶性物、高分子等多くのものを封入可能である。

本研究では、このような特徴を持つリポソームと美白作用を持つ Ai Luros を組み合わせることにより、従来の Ai Luros 含有香粧品よりも効果の高い製剤を作成することを目的として、Ai Luros 含有リポソームの効果について評価した。

【方法】超臨界逆相蒸発法で調製した 10wt%Ai Luros 含有リポソームを、1 ×10^5 個/well で一晩培養したメラノーマ細胞に添加し、Ai Luros 含有リポソームのメラニン産生抑制効果を評価した。

【結果・考察】Ai Luros 含有リポソームと Ai Luros 原液で比較したところ Ai Luros 含有リポソームは、Ai Luros 原液よりメラニン産生率を抑えた。Ai Luros 含有リポソームのメラニン産生抑制効果がリポソーム自身の効果ではないことを確認するため、Ai Luros が内包されてないリポソームについても実験を行ったが、Ai Luros が内包されてないリポソームではメラニン産生抑制効果が認められなかった。本結果から、Ai Luros 含有リポソームのメラニン産生抑制効果はリポソームの脂質によるものではなく、内包された Ai Luros によるものであり、リポソームに内包させることにより有意なメラニン産生抑制効果が得られたと考えられる。また、調製 2 週間後の Ai Luros 含有リポソームでは、調製直後に比べメラニン産生抑制効果が減少した。商品化の為には、今後安定性の改善を検討していくことが必要と考えられる。

【参考文献】

1)株式会社林原化学研究所　http://www/hyashibara.co.jp/html/press/2005/060525/index.html
2)Dermatol.,Vol.197,771-775(1991).
3)特許出願 2008-242296

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-057	氏　名	遠藤　卓弥
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	イオントフォレーシスによる塩酸リドカインの経皮吸収に及ぼす動物種差の影響		

【目的】経皮吸収製剤では、動物種の違いにより吸収量が大きく異なることが報告されている [1)]。一方イオントフォレーシスを用いた経皮吸収においては、経皮吸収量に及ぼす動物種の違いについては、細詳な検討は行われていない。そこで、本研究ではモデル薬物として、塩酸リドカインを用い、異なる動物皮膚にイオントフォレーシスを適用した場合の皮膚透過量を調べた。

【方法】有効透過面積 3.14cm^2 の Franz 型拡散セルに各種動物（ヘアレスマウス、ヘアレスラット、犬、モルモット）の皮膚を固定し in vitro 皮膚透過試験を行った。
Donor 側溶液中に棒状の銀電極で皮膚を傷つけないように、注意深くセットし、Receiver 側のサンプリングポートに棒状の銀/塩化銀電極をセットした。両電極間に直流電流発生装置から 0.1～0.3mA を 8 時間通電し、Receiver 側溶液を 1 時間おきにサンプリングし、この試料中のリドカイン濃度を測定し透過量を求めた。

【結果・考察】いずれの動物皮膚を用いた場合でも、電流を適用しない場合（Passive）に比べ、電流を適用した場合のリドカイン累積透過量は増加した。また、異なる大きさの電流（0.1 mA～0.3mA）を適用してそれぞれ透過実験を行ったところ、適用した電流値に比例してリドカイン累積透過量が増加した。動物間（ヘアレスマウス、ヘアレスラット、犬、モルモット）の累積透過量を比較すると、Passive では、ラットはマウスの 4.89 倍高かった。0.1mA の電流を適用した場合のラットの累積透過量は、マウスの累積透過量の 76%になり、0.3mA では 97%だった。電流値を上げることで、動物種の違いによる影響が小さくなることから、動物種の違いに起因する皮膚透過量の差よりも、電流によるリドカイン皮膚透過促進効果が大きいことがわかった。通常のテープ剤開発においては、実験動物からヒトへのスケールアップを行う場合、種差による透過量の違いを十分考慮すべきである。しかしイオントフォレーシス製剤の開発においては、スケールアップ時にこのような種差が見られず実験動物で得られた知見がヒト皮膚透過試験に直接結び付くことが期待できる。

【結論】動物種間によるリドカイン皮膚透過量は電流を適用しない場合には種差がみられ、電流を適用すると種差の影響は少なくなり、電流値を高くすると種差の影響がより少なくなる。

【参考文献】1) K.Sato et.al., J.Pharm. Sci., **80**, 104, 1991

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2008-058	氏　名	塩谷　知子
所属研究室	物理薬剤学講座		
研究テーマ	美白成分 Ai ルーロス含有リポソーム製剤の毒性評価		

【目的】Ai Lurosは、タデ藍(*polygonumyinctorium* Luros)の葉および茎から水で抽出して得た藍水抽出液と1,3-ブチレングリコール（保湿剤）の混合溶液である[1)]。藍は薬用植物として古くから人々に親しまれ、「神農本草経」や「本草網目」に記載されている[2)]。Ai Lurosには抗菌作用、抗ウイルス作用、抗酸化作用、抗がん作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、高脂血症改善作用などの作用がこれまでに報告されている。Ai Lurosのヒトにおける美白作用は、NOやPGE_2の産生を抑制して紫外線などによる炎症性の刺激がメラノサイトに伝達されるのを防ぐこと、およびメラノサイトにおいてチロシナーゼの活性を阻害してメラニン生成を抑制することで発現する。本研究では美白効果がより高い剤型、製剤の開発を目的として、有機溶媒を用いることなくリポソームを調製することができる方法であるISCRPE法[3)]で調製したAi Luros含有リポソームの毒性を評価した。さらに、薬効評価を行うための*in vitro*実験系の確立についても検討を行った。

【方法】マウスB16メラノーマ細胞を用いて毒性評価及び薬効評価実験系の確立を行った。毒性評価については MTS ASSAY によりメラニン抑制効果を求め評価した。また、薬効評価の実験系確立では ASSAY までの時間を検討した。さらに、リポソームに含有する Ai Luros 量についても Ai Luros 含量 2wt%, 10wt%で検討を行った。なお、各条件下でのメラニン産生抑制効果については、特許出願 2008-242296 に記載の方法[4)]に従って評価を行った。

【結果・考察】Ai Luros 含有リポソームの毒性を評価したところ、Ai Luros をリポソームに内包することによってリポソームに内包していない Ai Luros よりも毒性が低減していることが明らかとなった。さらに、薬効を評価するための実験系を確立するため、培養時間の検討を行ったところ、リポソーム溶液添加後 48h で評価することが最適であることが明らかとなった。また、含有する Ai Luros 量の検討では、10wt%Ai Luros 含有リポソームの方が、2wt%Ai Luros 含有リポソームに比べて強いメラニン産生抑制効果を示した。メラニン抑制効果があると証明されているコウジ酸と同等の抑制効果が Ai リポソームにもみられたためである。

【結論】Ai ルーロスのリポソームは Ai Luros のメラニン産生抑制効果を増強し、一方で毒性を低減できることが明らかとなり、今後美白製剤としての開発が期待される。

【参考文献】

1)株式会社林原化学研究所　http://www/hyashibara.co.jp/html/press/2005/060525/index.html

2)FRAGRANCE　JURNAL 2006-9 藍ルーロスの化粧品分野における機能性
末本保雄　京野文代　竹内誠人

3)*Langmuir* 2006**,22**,2543-2550
Preparation of Liposomes Using an Improved Supercritical Reverse Phase Evaporation Method

4) 特許出願 2008-242296

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-073	氏　名	下地　益功
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	イオントフォレーシスを用いた免疫抑制ワクチンの経皮吸収製剤の開発		

【目的】抗ヒストン H1 抗体のミメティックエピトープ[1]である SSV にキャリアタンパクとして Keyhole Limpet Hemocyanin（分子量 : 約 500 万　以下 KLH）を結合させた KLH-SSV を用いて、免疫抑制ワクチンの効果的な投与を目的としたイオントフォレーシスを用いた経皮吸収製剤について検討した[2]。

【方法】製剤 : 陽極には銀箔、陰極は銀を電解して作成した銀/塩化銀箔を電極として用い（有効通電面積 : 3.14cm^2）、これらに不織布を重ね、生理食塩水または、KLH-SSV 溶液(約 160~650 μ g/ml)を 200 μ L 加え、陽極製剤または陰極製剤を作成した。KLH-SSV を陽極側に適用する時には溶媒として水を使用し、陰極側ではトリス塩酸緩衝液（20mM pH8.5）を使用した。

投与 : バリカンとクリームで除毛したマウスの腹部および背部の皮膚に陽陰両製剤を貼付し、両製剤間に直流電源装置から 1.57 mA　を 8~30 分間通電した。投与を 2 週間毎に行い、投与前または各投与後 2 週間後に尾静脈より経時的に採血した。

測定 : KLH－SSV をコーティング液（100mM $NaHCO_3$ 水溶液）で 1 μ g/mL に調製し、96 穴マイクロプレートに 50 μ L ずつ添加し 30 分間室温放置した。プレートを 0.05%Tween20 含有リン酸緩衝液（PBST）で洗浄後（3 回）、そこにブロッキング液（3% スキムミルク、1%BSA pH7.4 リン酸緩衝液）を 200 μ L 加え 1 時間室温で放置した。これを PBST を用い洗浄後（3 回）、PBST にて 1000 倍希釈した血清サンプルを、50 μ L 加え 1 時間室温で放置した。さらにこれを PBST にて洗浄後（3 回）、二次抗体（Goat(a)-mouse IgG (Fc) pAb-HRP）を 50 μ L 加え 1 時間室温で放置した。これを PBST にて洗浄後（3 回）、発色剤（2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulufonic acid)を 50 μ L 加え、30 分または 1 時間室温放置後、405nm で吸光度を測定した。

【結果・考察】KLH-SSV 濃度が約 160~650 μ g/ml の間では適用濃度に依存して抗体価が上昇する傾向が見られた。また、投与時の電流適用時間を 8、15、30 分と変化させても抗体の発現には大きな差が見られなかった。陽極製剤、陰極製剤の両方に KLH-SSV 溶液を適用した場合と陽極陰極のいずれか一方に KLH-SSV 溶液を適用した場合を比較すると両極に含有させた方が抗体価の上昇が高く、次いで陰極のみ含有、陽極のみ含有の順であった。

【結論】イオントフォレーシスを用いて KLH-SSV を高い濃度で陽陰両極に含有させ投与間隔を 2 週間毎とすることで投与開始 3 回目から抗体価の発現が見られる経皮適用免疫抑制ワクチンの開発が可能となった。

【参考文献】　1) Kuei-chen et.al, J Immunol.,**182**, 4283, 2009

2) 池澤直樹ら, 日本薬学会第 131 年会要旨集, 2011, **4**, pp.168

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-089	氏　名	前川　美月
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	美白成分 Resveratrol 含有リポソーム製剤のメラニン産生抑制効果に関する研究		

【目的】Resveratrol（*trans*-3,5-4'-trihydroxystilbene）は、メラニン産生過程において Resveratrol 自身が酸化されることにより、チロシナーゼによるチロシンの酸化を阻害しメラニン産生を抑制することで美白効果を示す[1)]。しかし、Resveratrol は、水に難溶であるため水性製剤に高用量含有させることが難しいこと、*in vitro* の実験において高濃度領域で毒性を示すことが報告されている。リポソームはリン脂質二分子膜で構成されており、その脂質部分に脂溶性物質を封入することで脂溶性物質の水への溶解性を向上させることができる。本研究では、阿部らが開発した Supercritical reverse phase evaporation(SCRPE;超臨界逆相エバポレーション)法[2)]で調製したリポソームの有用性評価を目的として、*in vitro* メラニン産生抑制効果を調べた。

【方法】超臨界逆相エバポレーション法で調製した Resveratrol 内包リポソームをメラノーマ細胞に添加したときのメラニン産生抑制効果を評価した。実験は次のとおり行った。1×10^5 個/well で細胞を撒き、一晩培養した後、Resveratrol 内包リポソームを添加した。48 時間後に細胞を溶解し、490nm の吸光度を測定することでメラニン産生量を評価した[3)]。

【結果】リポソームに内包していない Resveratrol に比べて Resveratrol 内包リポソームは有意に強いメラニン産生抑制効果を示した。また、本リポソーム製剤の安定性を評価するため、1 週間あるいは 1 カ月室温保存した製剤についてメラニン産生抑制効果を調べた結果、リポソーム調製直後に比べ、1 週間後の製剤では 10%程度メラニン産生抑制効果が低下し、さらに 1 カ月後ではメラニン産生抑制効果を示さなかった。

【考察】本研究の結果、Resveratrol をリポソーム化することにより水への溶解性を向上させ、Resveratrol のみに比べ強いメラニン産生抑制効果を発現することが明らかとなった。しかし、時間の経過とともにその効果は著しく減弱したことから、今後動的光散乱法を用いて粒子径を測定するなどしてリポソームの物理的変化を検討し経時変化の原因を明らかにした上で安定性の向上を検討していく必要があると考えられる。

【参考文献】

1)P.BERNARD and J.-Y.BERTHON
Greentech S.A.,Biopole Clermont Limagne,63360 Saint Beauzire Cedex.France
Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition International Journal of Cosmetic Science.22 219-226(2000)

2)Tomohiro Imura, Toshihiro Gotoh, Katsuto Otake, Satoshi Yoda, Yoshihiro Takebayashi, Shoko Yokoyama, Hitoshi Takebayashi, Hideki Sakai, Makoto Yuasa and Masahiko Abe
Control of Physicochemical Properties of Liposomes Using a Supercritical Reverse Phase Evaporation Method *Langmuir* 19 2021-2025 (2003)

3)特許出願：2008-242296

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-139	氏　名	宮崎 里志
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	免疫抑制活性を有する抗体の免疫抑制活性を有する抗体の免疫抑制活性メカニズムの解析		

【目的】免疫抑制剤のタクロリムスは、リンパ球細胞内の FK-506 binding protein に結合し、インターロイキン 2（細胞性免疫を誘導するサイトカイン）の産生を抑制することで免疫抑制効果を示すことが知られている。中野らは肝臓移植後に血清中に産生されるヒストン H1 を認識する抗体が免疫抑制活性を有することを報告したが、その分子メカニズムについては分かっていない。

制御性 T 細胞(以下 Treg)は、末梢での免疫応答の調節を担っており、細胞性免疫応答に対して抑制的に作用することが知られている。片山らは、免疫抑制活性を有する抗ヒストン H1 抗体の *in vitro* 免疫抑制活性の評価実験において、免疫抑制性抗体の濃度依存的に制御性 T 細胞と共に免疫抑制活性を示すことを報告した[1)]。すなわち、抗ヒストン H1 抗体の濃度がある濃度領域のとき、抗ヒストン H1 抗体は Treg に直接作用し、Treg からのシグナル伝達によって T 細胞活性化を抑制するという結果を示した。このことは、免疫抑制性抗体の作用メカニズムが既存の免疫抑制剤の作用メカニズムとは異なることを示唆している。SSVLYGGPPSAA 配列を抗原として認識する抗 SSV 抗体は、抗ヒストン H1 抗体と同様に、*in vitro* および *in vivo* で免疫抑制活性を示すことが報告されている。本研究では、抗 SSV 抗体の免疫抑制活性発現における Treg の関与について明らかにすることを目的とする。

【方法】96well 平底 plate に 5μg/mL の anti-mouseCD3 抗体を 100μL/well でコートし、over night した。マウスから脾臓細胞を取り出し、MS カラムにより精製 T 細胞とし 2×10^5cell/mL に調整した。この T 細胞に SSVmAb を終濃度 2-10μg/mL となるように添加し、先述の平底 96well プレートに 100μL/well で巻き込み 24hr 培養した。24hr 後に T 細胞と同様に脾細胞から MS カラムにより精製した Treg を 2.5×10^4cell/mL にし、100μL/well で巻き込み 72hr 培養した。培養終了 15hr 前に BrdU を添加し、培養終了後に BrdU の細胞への取り込み量を測定した。

【結果・考察】CD3 刺激により T 細胞は増殖する。しかし、この系に SSV mAb を添加すると、SSV mAb 無添加の CD3 刺激 T 細胞よりもそれぞれの濃度で BrdU の取り込み量が減少し、細胞増殖が抑制された。5μg/mL の SSV mAb を添加した T 細胞において、特に BrdU の取り込み量が減少しており、この結果から 5μg/mL の SSV mAb を添加したときに、最も強い免疫抑制活性を示すことが明らかとなった。今後、Treg の存在下、非存在下で SSV mAb の免疫抑制能の違いを比較し、免疫抑制活性メカニズムを解明していく予定である。

【参考文献】

1)　広島大学大学院修士論文, 片山, 2009 年

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-141	氏　名	矢吹　裕太
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	イオントフォレーシスを用いた塩酸リドカイン製剤の局所麻酔効果に関する研究		

【目的】臨床の場において注射針穿刺(留置針刺入)時の疼痛除去は、患者の苦痛緩和及び医療処置を容易にする上で必要とされている。現在、局所麻酔効果を目的としリドカインテープ（ペンレス®）が上市されているが、効果は低く、発現も遅い。そこで、リドカイン含有製剤を調製し、電気を利用した経皮吸収促進法（イオントフォレーシス：IPS）によって投与し、局所麻酔効果を調べた。また、リドカイン皮膚透過量や皮内濃度を調べた。

【方法】IPS 製剤：陽極電極は銀箔を用い、これに 10%塩酸リドカイン含有ポリビニルアルコール(PVA)ゲルを添加（LID 製剤）または 10%塩酸リドカインと 0.1%アドレナリンを含有した PVA ゲルを添加し（LID-AD 製剤)、陽極製剤とした。陰極は銀/塩化銀箔を用い、これに塩化ナトリウム含有 PVA ゲルを添加し陰極製剤とした。テープ製剤：市販されているペンレステープ®（ペンレス）を用いた。薬効試験：除毛したモルモットの背部に陽陰両製剤を貼付し、直流発生装置から 2.8mA を 10 分間通電した。ペンレスは 60 分間貼付した。投与前、剥離直後、剥離 30 分後、60 分後にピンプリック試験[1)]を行った。*In vitro* 透過試験： Franz 型拡散セルにモルモットの皮膚を固定し、角質層側に IPS 製剤を、receiver 側に棒の銀/塩化銀電極を用い、両極間に 1.0mA を 8 時間通電し、経時的にサンプリングを行った。皮内濃度試験：ピンプリック試験後に製剤貼付部の皮膚を切り取り、ホモジネート後、リドカイン濃度を測定した。

【結果・考察】ピンプリック試験において、製剤剥離直後は LID 製剤、LID-AD 製剤とも高い局所麻酔効果を示した。剥離後 30 分、60 分後では LID 製剤に比べ LID-AD 製剤の方が効果が高く持続された。一方、ペンレスでは 60 分間貼付したにもかかわらず剥離直後から効果は低かった。*In vitro* 透過試験におけるリドカインの 8 時間までの累積透過量は、LID 製剤、LID-AD 製剤はペンレスに比べで有意に高かった(LID 製剤 : 2111.8±235.2、LID-AD 製剤 : 1598.4±50.2、ペンレス : 129.09±51.73 μ g/cm^2)。IPS で高い麻酔効果を示すのは、皮膚を透過するリドカイン量が多いためと思われる。しかし、LID 製剤と LID-AD 製剤を比較すると有意な差はないものの、LID 製剤の透過量が高く、これは剥離後 30 分、60 分の麻酔効果の結果と反する。そこで皮内濃度を測定した。剥離直後の皮内濃度は LID 製剤と LID-AD 製剤でそれぞれ 520.3±74.0、731.82±98.0 μ g/g であったが、剥離 60 分後では 230.8±34.2、402.5±57.6 μ g/g と LID-AD 製剤に比べ LID 製剤で有意（$p<0.1$）に低くなった。LID-AD 製剤で薬効が維持されたのは血管収縮薬であるアドレナリンを含有させる事により、長時間リドカインを皮内に滞留させたためと思われる。

【結論】

・IPS を用いた製剤により高い局所麻酔効果を得ることができた。

・全身性の経皮吸収製剤と異なり、リドカインのような皮膚局所で作用する薬では皮内の薬物量を測定し評価する必要がある。

【参考文献】1）E. Bulbring et. al., J Pharmac. Exp. Ther., 85, **78**, 1945

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-206	氏　名	青木　さくら
所属研究室	物理薬剤学研究室		
研究テーマ	新規抗体の大量調製及び in vivo 免疫抑制活性評価		

【目的】中野らは、肝臓移植後の血清中に産生されるヒストン H1 を認識する抗体が免疫抑制活性を示すことを報告した [1]。さらに江らは、ファージディスプレイ法を用いて抗ヒストン H1 抗体が認識するペプチド配列を同定し、2 種の 12 残基ペプチドを得た。2 種のペプチドの一つである、SSVLYGGPPSAA 配列を有するペプチドをもとにハイブリドーマを作製したところ、ハイブリドーマから産生される抗体（以後、抗 SSV 抗体という）は、*in vitro*, *in vivo* ともに有意な免疫抑制活性を示した。一方、LPQNVWLHGWHT 配列を有するもう一方のペプチド（以後、LPQ ペプチドという）をもとに作製したハイブリドーマから産生される抗体（以後、抗 LPQ 抗体という）も抗 SSV 抗体と同様に *in vitro* で免疫抑制活性を示したが、抗 SSV 抗体に比べ弱い免疫抑制活性であった。抗原－抗体反応は、特異性と親和性で表される抗原に対する抗体の結合親和性によって生体内での作用が大きく異なってくる。ヒストン H1 に対する抗 SSV 抗体あるいは抗 LPQ 抗体との結合活性評価では、抗 LPQ 抗体は抗 SSV 抗体よりもヒストン H1 に対する結合活性は弱いことが報告されている。今後、抗ヒストン H1 抗体から見出されたこれら新規抗体を免疫抑制剤として開発していくためには、その効果と副作用についてより詳細に検証していく必要がある。そこで、本研究では抗 LPQ 抗体の *in vivo* での効果と副作用を評価することを目的として、抗 LPQ 抗体の大量調製と本抗体を用いた *in vivo* 評価を行うことを目的とする。

【方法】LPQ hybridoma を培地（PMRI メディウム+15％FBS+ 1 ％抗生物質）中で培養し、その培養上清を回収した。次に、培養上清に硫酸アンモニウムを添加して除タンパクした。除タンパク後の上清を LPQ カラムにより精製した。電気泳動により、抗体の精製の程度および目的とする抗体であることを確認した。精製したすべての抗体を集め、ELISA により調製した抗 LPQ 抗体量を算出した。

【結果】ハイブリドーマを３ヶ月培養して得た培養上清より精製した抗 LPQ 抗体についてカラム精製後、電気泳動で確認したところ、重鎖の 52kDa 及び軽鎖の 25kDa に単一のバンドが認められた。培養上清を用いた同様の実験では複数のバンドが検出されていたが、1 回のカラム精製で動物実験に用いることができる抗 LPQ 抗体を得ることができた。ELISA により抗体量の確認を行ったところ、抗体量は 2.64mg であることが分かった。

【考察】本研究で得られた抗 LPQ 抗体量は 2.64mg であった。*in vivo* のラット臓器移植モデルで本抗体の免疫抑制活性を評価するために必要な抗体量は 2～3mg と試算しており、得られた抗体量で充分に *in vivo* 実験が可能であると判断した。今後、MLR 抑制実験を行い、*in vitro* での本抗体の免疫抑制効果を確認した後、*in vivo* のラット臓器移植モデルで免疫抑制活性評価を行う。その際、本抗体を免疫抑制剤として開発していくために、副作用についても検証していく予定である。

【参考文献】1) *Transplantation*, **Vol.77(10)**, 1595-1603(2004)

卒業実験報告書（2011 年度）

学籍番号	PC2006-134	氏　名	橋本　康弘
所属研究室	生物有機化学研究室		
研究テーマ	注射薬・輸液の配合変化		

【目的】

配合変化が起こってしまった注射薬、輸液は、期待された薬効が発揮されないどころか患者さんに健康被害を与えてしまう可能性があります。さらに、薬の無駄を出さないことは、薬剤の経済的な面からも大切な要素となります。これからの薬剤師にとって注射薬、輸液や抗がん剤の混注は日常業務であり、配合変化を回避するための知識は必要不可欠です。しかし、大学では重点的に講義を受けなかったので、実務実習中に自分の勉強不足を強く感じ、注射薬や輸液の配合変化について調査研究を行いました。

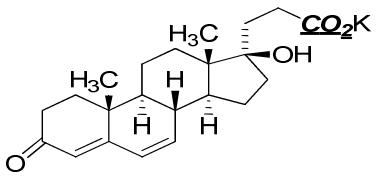
【調査内容】

注射薬の配合変化を pH 依存性と pH 非依存性に分け、pH 依存性配合変化が起こる薬剤に着目して調査を行いました。病院で実際に使用されていた薬剤を塩基性と酸性に分け、それぞれの構造の違いに着目しました。

塩基性溶液で市販されている医薬品

ソルダクトン（カンレノ酸カリウム）

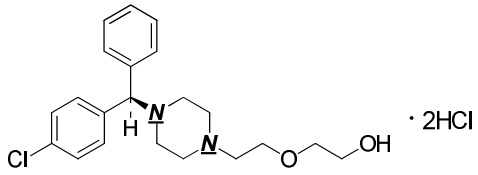
pH9.0～10.0



酸性溶液で市販されている医薬品

アタラックスP（ヒドロキシジン塩酸塩）

pH3.0～5.0



更に、臨界点 pH に着目をして調査を行いました。臨界点 pH とは、「pH を移動させ、その間に起こる変化を 24 時間観察し、変化がまったく認められない臨界の点を臨界点とし、その時の pH を臨界点 pH とする」という今までの変化点 pH とは違った概念です。この考えを応用し、pH 変動スケールと予測の式 $pH = a + (b - a) \times (Dmax \times \alpha max) / \Sigma (Di \times \alpha i)$ を使用し、配合変化を予測する方法を調査しました。

【結果・考察】

pH 依存性配合変化を防ぐため構造から読み取るべきことは、その主成分の薬剤が酸性を示す官能基あるいは、塩基性を示す官能基を含んでいるかどうかです。また、可溶化をさせるために pH が調整されている薬剤ならば製剤の pH はどちら側に傾いているのか考えることが重要です。更に、上記の式を使用し混注後の pH の予測を立て、インタビューフォーム等に掲載されている配合変化が起こる pH を読み取り、どのような配合変化が起きるのかを予測することが大切です。今後は、上記の式が改良され幅広い配合変化の予測に実際に使われるようになれば良いと考えます。そして、製薬企業や病院などが手を組み、実際の配合変化の様子、混注を行った薬剤における pH 変動スケールの自動作成、配合変化が起こった場合の情報の共有化などができる、配合変化におけるデータベースの作成は、医療現場で混注を行う際に有用な情報提供になると私は考えます。

卒業実験報告書（2011 年度）

学籍番号	PC2006-150	氏　名	市川　裕己
所属研究室	生物有機化学研究室		
研究テーマ	後発医薬品に関する調査		

【背景】

私は病院実習にて、後発医薬品(以下、GE)について、先発医薬品(以下、新薬)と添加物が異なる事によって、副作用が出るかもしれない、小企業では安定供給が得られない可能性がある等の注意点を学び、GE はあまり使用したくないスタンスが出来上がった。しかし、その後の実習先の薬局では、積極的に GE の使用の意向を患者に伺っていたので、GE に対する病院との意識の差を感じた。いずれ私も現場で働く様になれば、GE を調剤する機会があるはずなので、このわだかまりを解消するために卒業研究で GE について調査研究を行った。

【調査内容】

中央社会保険医療協議会が薬剤師、医師を対象に行ったアンケートの結果を参考に、何故日本で GE の普及が遅れているのかを調査した。

【結果・考察】

日本において、医療財政改善のために GE の普及が望まれているにもかかわらず、普及が進まないのは、以下 3 つの要因が大きい事がわかった。

新薬との同等性への不安：薬効の強さや発現頻度は、作用部位中の薬物血中濃度によって決定される為、同一薬物を同一量含有する新薬と GE の臨床上の有効性・安全性を比較したい場合、薬物血中濃度の時間推移が 2 製剤間で重なっている事を示せればよい。具体的には GE の示す C_{max}、AUC の幾何平均の差の 90%信頼区間が、新薬の幾何平均を 100%とした時に、80%から 125%の範囲に入っていれば生物学的に同等であると判断される。非常に厳しい条件であると思うが、これに異議があれば議論されるべきだと思う。

安定供給への不安：厚生労働省が安定供給に関して製薬企業が遵守すべき要件を定めており、これが遵守されていなければ、該当企業に指導が入る体制が整っている事で、改善されていくと思われる。

情報提供体制への不安：GE には製造販売の承認要件として臨床試験が求められていない。従って安全性の情報に関しては、上市後に GVP に則り、副作用情報を収集・評価し対応していくしかないため、販売直後に情報が少ないと非難するのはいささか理不尽である。これからの医療従事者には新薬と同様に副作用情報を企業に還元する等、GE を育て上げていく事に協力的な姿勢をとる事が必要になってくると思う。

薬剤師は、新薬と GE それぞれの利点・欠点を患者にきちんと提示し、患者自身にニーズに合わせて選んで頂く、すなわち薬物治療の選択肢を広げるのが薬剤師の役割であると思う。薬学 6 年制の薬剤師として、患者にも医療経済にも貢献できるようになりたいと考える。

【参考文献】

後発医薬品の使用状況調査 結果概要（中央社会保険医療協議会）
http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200000105vx-att/2r985200000106er.pdf

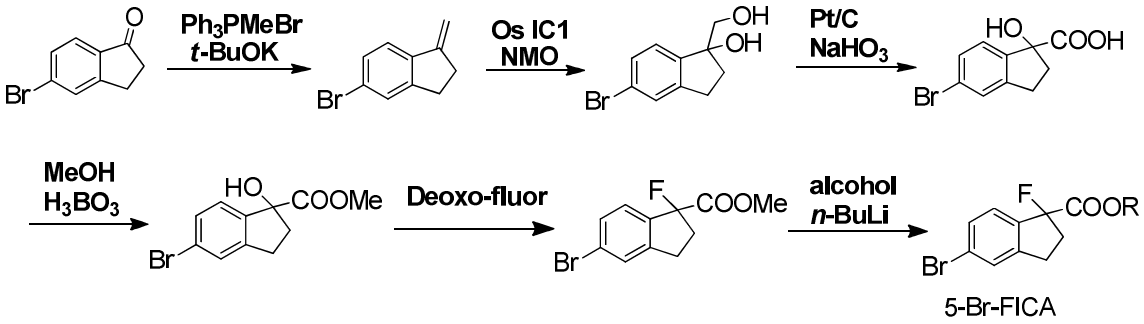
卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-158	氏　名	金澤　達矢
所属研究室	生物有機化学研究室		
研究テーマ	新規含フッ素絶対配置決定試薬の開発と評価		

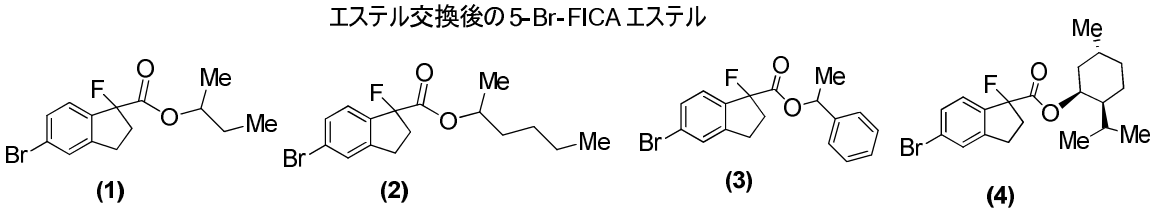
研究概要

【目的】今日の不斉合成分野の進歩により、簡便に絶対配置を決定できる絶対配置決定試薬（以下、CDA：chiral derivatizing agent）の開発が望まれてきている。サリドマイド薬害事件以来、光学活性医薬品の絶対配置を決定することは必要不可欠となっている。本研究では新規 CDA として当研究室で設計・開発した FICA (1-fluoroindan-1-carboxylic acid) に新たな置換基として Br を導入し、既存の FICA との性能の比較・検討を行った。本研究では、新たな置換基の導入により NMR における化学シフト差をさらに大きくすることと、収率や試薬の安定性の向上を狙うことの二点を目的として実験を行った。

【実験】5-Br-FICA の合成は、既存の FICA の合成経路に沿って行った。



エステル交換後の 5-Br-FICA エステル



以上のようにして合成した 5-Br-FICA を用いてキラルな第２級アルコールとエステル交換を行った。^{1}H-NMR や ^{19}F-NMR を用いてジアステレオマー間の化学シフト差を算出し、既存の CDA との比較・検討を行った。

【結果・考察】まず、原料である 5-bromo-1-indanone からの総収率は 33%と比較的よい結果で 5-Br-FICA を得ることができた。これは 4-Me-FICA と同等であり、5-Me-FICA よりも 10%以上高い数値である。安定性については今回は検討できなかった。－20℃程度で結晶化の傾向が見られたため、今後検証していく必要性があると考えられる。次に試薬の CDA としての性能について今回は 4 種類のアルコールとエステル交換を行い、それらのジアステレオマー(1)~(4)の化学シフト差を求めた。$\Delta\delta_F$ 値は FICA エステルの値とほぼ同じであったが、2-hexanol と(+)-neomenthol については 0.02~0.05ppm 程度、既存の FICA を上回った。^{1}H-NMR の値については FICA よりも 0.01~0.1ppm ほど下回る結果となったが、数値にそれほど大きな差は見られなかった。今後さらに、他のアルコールについても検討を重ねる必要があると考えられる。

卒業論文（2011 年度）

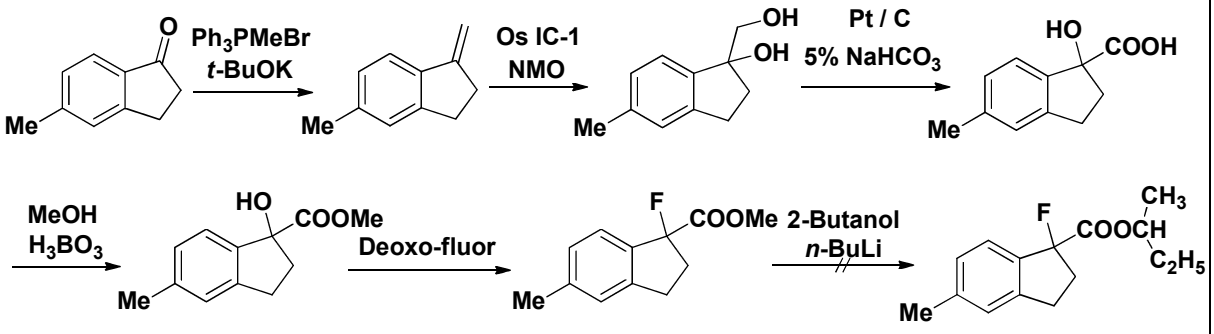
学籍番号	PC2006-159	氏　名	鎌田　遼
所属研究室	生物有機化学研究室		
研究テーマ	新規含フッ素絶対配置決定試薬の開発		

研究概要

【目的】FICA (1-fluoroindan-1-carboxylic acid) は、当研究室で開発した ^{19}F-および ^{1}H-NMR の両方が使える新規含フッ素絶対配置決定試薬である。FICA を光学活性アルコール、またはアミンと反応させ、得られたエステルあるいはアミドのジアステレオマーの NMR 測定を行い、それらの化学シフト差を計算することでアルコールやアミンの絶対配置を決定できる。今回は、FICA に置換基を入れることで、化合物の安定化や結晶化、NMR における化学シフト差を大きくすることを目的として実験を行った。すでに当研究室で合成した 4-Me-FICA との比較をするために、今回 5-Me-FICA の合成を行なうことにした。

【方法】5-Me-FICA Me ester の合成は、4-Me-FICA Me ester の合成法に従って行った。出発原料として 5-methyl-1-indanone を用い、始めに Wittig 反応によるエキソメチレン基の導入を行った。続いて、オスミウム酸化を行ってジオールとし、これを酸化させることによって、α-ヒドロキシカルボン酸を得た。このカルボン酸を、ホウ酸存在下でメタノールと反応させ、メチルエステルとした。次いで、水酸基を Deoxo-fluor を用いてフッ素に置換した。合成した 5-Me-FICA Me ester の 2 級アルコールとのエステル交換を行った後に、得られたジアステレオマーの NMR 測定を行うことにより、試薬としての性能を評価しようと試みた。

【結果】5-Me-FICA Me ester はエステル化の過程までにおいては、4-Me-置換体と比較して大差ない収率で合成することができた。しかし、Deoxo-fluor によるフッ素化では、5-Me-置換体は収率が 52%であり、4-Me-置換体の 92%と比較してかなり低かった。そこで、Deoxo-fluor の当量を 30 当量まで増やしたが、収率の向上は 4%に留まった。次いで、合成した 5-Me-FICA Me ester と 2-butanol を反応させエステル交換を試みたが、反応はまったく進行しなかった。



【考察】5-Me-FICA Me ester の合成において、フッ素化反応の収率が 4-Me-FICA Me ester と比較すると低かった。これは、5 位のメチル基の電子供与性によって、求核置換反応であるフッ素化やエステル交換が進行しなかったと考えられる。

【結論】5-methyl-1-indanone を出発原料として 5 工程で 5-Me-FICA を合成した。しかし、5-Me-FICA Me ester のキラルアルコールとのエステル交換反応は進行しなかった。そのため、5-Me-FICA Me ester の絶対配置決定試薬としての評価を行なうことはできなかった。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-101	氏　名	石原　悟史
所属研究室	生体分析学研究室		
研究テーマ	PURESYSTEM を用いたタンパク質合成系における D - アミノ酸取り込みの検出法の開発		

【目的】一般に生体はタンパク質の合成にL - アミノ酸のみを利用しD - アミノ酸は用いないと言われている。そこで、今回の私はグリシンを除く 19 種類のアミノ酸をそれぞれL体からD体に変えた場合タンパク質合成が行なわれるのか検討することを目的とし、20 種類のアミノ酸が全て含まれるように設計した 3 種類のペプチドを用い無細胞タンパク質合成系である PURESYSTEM 系にD - アミノ酸を取り込めるのか検討を行なった。

【方法】タンパク質ではアミノ酸数にばらつきなどがあり、取り込みの評価が複雑になるため、20 種類のアミノ酸を一つずつ含むペプチドを設計することにした。その際、合成の簡便性を考慮し、20 種類のアミノ酸を一つのペプチド鎖にするのではなく、それぞれ MSQYIADRK、MNTHVFERK、MCLWGPGRK というように 3 種類のペプチドとしてデザインし、この 3 種類のペプチド合成を検討することで 19 種類のアミノ酸の検討を行なうことにした。これらアミノ酸配列を有するペプチドの鋳型となる DNA 鎖は PCR 法にて合成した。これらの DNA から mRNA を合成し、これらを用いて PURESYSTEM にてタンパク質の合成を行なった。合成されたペプチドは限外ろ過にてリボソームから分離し、Zip Tip にて脱塩・濃縮操作を行い、MALDI-TOF/MS を用い目的ペプチドの検出を行った。

これらのペプチドの合成を確認した後、次にアミノ酸混合液としてはペプチドに含まれる 9 種のアミノ酸のうち、1 つを D 体に置き換えたアミノ酸混合液を調整し、この混液をアミノ酸源として用いて PURESYSTEM で反応を行なった。反応終了後、上記の精製法を用いてペプチドの分離、濃縮操作を行い、最後に MALDI-TOF/MS を使って目的のタンパク質が合成されたかを確認した。

【結果・考察】まず全てL体を使って調整したアミノ酸混液では目的のペプチドの分子量のピークが得ることができ、ペプチドの合成を確認することができた。次に 1 種類のアミノ酸をD体に置き換えた混液のうち、MSQYIADRK のペプチドではアルギニンを D-アルギニンに換えたとき全長ペプチドのピークが検出でき、その他のアミノ酸では検出できなかった。MNTHVFERK のペプチドではフェニルアラニン又はアルギニンを D 体に換えたとき全長ペプチドのピークが検出でき、その他のアミノ酸では検出できなかった。MCLWGPGRK のペプチドではトリプトファン又はアルギニンを D 体に換えたとき全長ペプチドのピークが検出でき、その他のアミノ酸では検出できなかった。以上のことから、PURESYSTEM では D-フェニルアラニン、D-アルギニン、D-トリプトファンを取り込みうることがわかった。このことより、大腸菌などでは PURESYSTEM を用いることで D-アミノ酸をタンパク質合成に使いうることが示唆された。

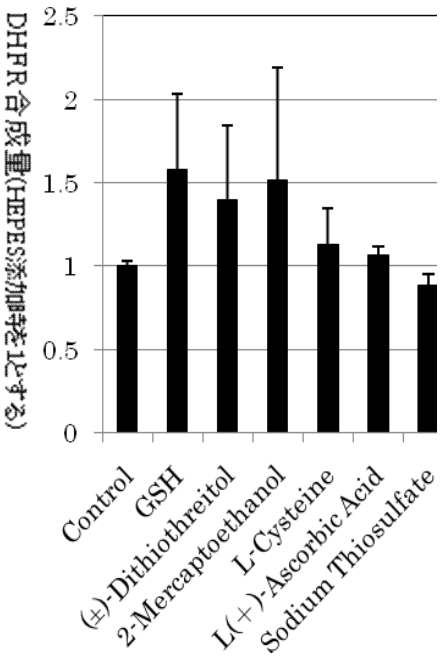
卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-156	氏　名	大谷　遥
所属研究室	生体分析学研究室		
研究テーマ	無細胞タンパク質合成系に対する還元剤の影響		

【目的】近年、無細胞タンパク合成系は、遺伝子からタンパク質を簡便かつ大量に得ることからできる方法として、着目されつつある手法である。本研究室では、アミノ酸のタンパク質合成に及ぼす影響について、*in vitro* 系で合成を行ったルシフェラーゼ及び GFP 等の mRNA を用い検討が重ねられており、チオール基(SH 基)を有する還元剤において有意にタンパク質合成量の増大が認められる事を明らかとしている。そこで今回、上記と異なる mRNA においても SH 基を有する還元剤によるタンパク質合成量増大効果が得られるか検証することを目的とし、mRNA としてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を用い、大腸菌由来の再構成無細胞タンパク質合成技術である PURESYSTEM により SH 基を有する還元剤の影響について検討を行った。

【方法】まず初めに、DHFRのmRNA を*in vitro*の系にて合成した。合成したmRNA を鋳型としPURESYSTEMに加え、6 種類の還元剤(グルタチオン(GSH)、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、L-システイン、L(+)-アスコルビン酸、チオ硫酸ナトリウム)をそれぞれ別々に添加した後、37 ℃で反応させタンパク質の合成を行った。反応液はYM-100に移し5000 G、4 ℃で30 分間遠心後、SDS-PAGEにてタンパク質の分離を行い、50 %(v/v)エタノール／7 %(v/v)酢酸で30 分間のゲル固定を2 回行った後、SYPRO-Rubyで一晩染色し、Typhoon9200を用いDHFRの検出・定量を行った。

【結果・考察】DHFRのタンパク質合成量の定量結果を右図に示す。 GSH、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノールなどSH基を有する還元剤においてコントロールと比べタンパク質合成量の増大する傾向が認められた。この増大について、GSHを用い、種々の時間・添加量にて合成量の変化を詳細に検討した。その結果、実験開始より3 時間後まではコントロールと比べタンパク質合成量の増大が認められ、それ以降ではコントロールと比べタンパク質合成量の増大は認められなかった。これらの結果から、DHFRのタンパク質合成過程においてもSH基を有する還元剤によりタンパク質合成量増大が見込めるが、時間の経過により還元剤が酸化を受けS-S結合が形成されることによってその効果が失われてくるものと考えられる。



【参考文献】Shingaki, T and Nimura, N., *Protein Expr. Purif.*, 77 (2), 193-197 (2011)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-203	氏　名	長束　彰啓
所属研究室	生体分析学研究室		
研究テーマ	温度感応性ポリマーの応用研究　～環境分野へ応用～		

【目的】水溶性高分子の中には、水溶液状態で特定の温度｛下限臨界共溶温度(LCST)｝以上の熱的刺激を受けると、相転移を起こし、白濁、析出するものがある。この白濁、析出したものを LCST 以下に戻すと再び溶解する。このような特徴を持つ親水性―疎水性可逆型高分子は温度感応性ポリマーと呼ばれ、LCST が 5 ℃から 85 ℃の範囲にあるものが存在している。中でも N－イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)の重合反応から生成される Poly(NIPAM)は操作が容易な転移温度な 32 ℃であり、その前後で素早く熱応答を示す。このような Poly(NIPAM)の性質を利用して、工業廃水における有害物質の捕捉、吸着し、再利用出来れば、有機溶媒を使わず、わずかな温度変化だけで分離が可能であり、水質の改善に伴う新たな廃棄物の排出が抑えられ、環境にも優しい。本研究は温度感応性ポリマーである Poly(NIPAM)の捕集能をモデル物質としてアントラセンを用いて検討を行った。

【方法】浦川らの研究を参考に Poly(NIPAM)修飾シリカゲルを作成。パスツールピペット内に脱脂綿、及び Poly（NIPAM)修飾シリカゲル(100 mg)とでカラムを作成した。アントラセン(10 mg)を MeOH (1 ml)に溶かし、さらにアントラセンの溶液(40 μl)を精製水(6 ml)に加え撹拌し、アントラセンの溶液を 1.5 ml ずつ 2 つに分け、低温条件、高温条件でカラムを通過させ、逆相クロマトグラフィーにて測定、UV(254 nm)にて検出。また高温条件で溶液を 3 ml 通過させ 0.5 ml ずつ計 6 本採取し、アントラセンの吸着量を測定。カラムを高温から低温に戻し、精製水を通過させ、0.5 ml ずつ採取し、吸着したアントラセンの溶出量を測定した。

【結果・考察】逆相クロマトグラフィーで測定したところ、低温条件ではアントラセンのピークが確認されるのに対し、高温条件ではピークが検出されなかった。高温条件で溶液を 3 ml 通過させ 0.5 ml ずつ計 6 本採取した溶液を 1 本ずつ逆相クロマトグラフィーで測定したところ 6 本ともに目立ったピークは検出されなかった。また低温に戻し、通過させた精製水を 0.5 ml 採取したものを 1 本ずつ先程と同様に測定したところ、アントラセンの溶出が確認された。

【考察】低温条件では Poly(NIPAM)が親水性を示すため、疎水性であるアントラセンは吸着されずピークが検出され、高温条件では Poly(NIPAM)が疎水性を示すため、アントラセンが吸着されピークが検出されないことが明らかとなった。また高温条件で吸着したアントラセンが低温条件にすることで可逆的な反応を吸着、脱離し、溶出してくることが明らかとなった。

【結論】温度感応性ポリマーは溶液温度の変化に伴い、親水性／疎水性の相転移を示す事を利用して工業廃水に含まれる有害物質の吸着、分離、回収に利用可能なことが示唆される。

【参考文献】浦川稔寛, 福岡県工業技術センター研究報告, No.16, Page4-7 (2006)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-012	氏　名	大野　あすみ
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	細胞内 c-di-GMP 量を調節する *yfeA* 遺伝子のクローニング、大腸菌での発現		

【目的】細菌のバイオフィルム形成は、多くの難治性感染症や病院内感染などに関与し、注目を集めている。バイオフィルム形成には、セカンドメッセンジャーである cyclic di-GMP（以下 c-di-GMP）の細胞内量が大きく関与し、細胞内 c-di-GMP 濃度を調節する酵素遺伝子が存在する。私の卒業研究では c-di-GMP 合成の酵素活性を持つ GGDEF ドメインと分解の酵素活性を持つ EAL ドメインの両方を持つ複数膜貫通型蛋白質をコードする遺伝子 *yfeA* を大腸菌に導入し、その過剰発現株の性質を調べることで YfeA の生理学的機能を特定することを目的として、発現ベクターへの *yfeA* クローニングから実験を開始した。

【方法】*yfeA* を pTrc99A ベクターあるいはプロモーター活性の低い pTrc99A(p206)ベクターにライゲーションし、*E.coli*-TG1 株および *E.coli*-BW25113 株のコンピテントセルへ形質転換した。その後、*yfeA* 導入株の運動性の評価およびバイオフィルムアッセイを行なった。

【結果】　運動性: TG1 株の運動性は、ベクタープラスミド単独の影響が見られた。IPTG 0.01mM 誘導下、pTrc99A 保持株では運動性に顕著な影響は見られなかったが、プロモーター活性の低い pTrc99A(p206)を保持した株は意外なことに 1.6 倍の運動能上昇を示した。しかし、TG1/pTrc99A(p206)-*yfeA* の運動能は、プラスミドを保持しない TG1 株とほぼ同程度になり、*yfeA* 遺伝子の存在で、ベクター単独による運動性の上昇がキャンセルされた。一方、高いプロモーター活性の TG1/pTrc99A-*yfeA* の運動能は、TG1 株の 1.4 倍で逆に運動能を上昇させた。

バイオフィルム形成能: LB 培地、IPTG 非誘導の条件下において、TG1/pTrc99A で 2.3 倍、TG1/pTrc99A(p206)で 1.5 倍のバイオフィルム形成促進が観察され、運動能同様に、ベクタープラスミド単独の影響が見られた。*yfeA* 遺伝子の存在下では、TG1/pTrc99A-*yfeA* では 2.5 倍、TG1/pTrc99A(p206)-*yfeA* は 2.8 倍となり、さらにバイオフィルム形成が促進された。*yfeA* 導入の効果としては、プロモーター活性に依存せず、バイオフィルム形成能を上昇させたが、その上昇度は、プロモーター活性の低い TG1/pTrc99A(p206)-*yfeA* の方が高かった。

【考察】今回非常に興味深いことに、野生株に発現ベクターを導入するだけでも運動性やバイオフィルム形成能に影響を与えていることがわかった。運動性に与える YfeA の影響としては発現ベクター単独の運動性に与える影響と逆方向に変化させており、YfeA が運動能の微妙な調節に機能していることが示唆された。この結果は、YfeA が GGDEF と EAL の両方のドメインを持つことが関与しているかもしれない。バイオフィルムアッセイの結果からは、YfeA の過剰発現がバイオフィルム形成を促進したが、その促進は、プロモーター活性や IPTG 誘導に比例した上昇ではなく、YfeA の至適濃度が必要であると考えられた。

【結論】今回、YfeA は、バイオフィルム形成を促進することが明らかになった。また運動性においてはその活性を状況に応じて正にも負にも調節していると思われる結果を得た。細菌特有のセカンドメッセンジャーの細胞内濃度の変動が細菌の生理機能を巧妙に調節していることが示唆された。

【参考文献】Cyclic di-GMP as a second messenger. Current Opinion in Microbiology, 9:218–228 (2006)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-016	氏　名	川原園　悠
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	新規抗 MRSA 薬、リネゾリドの耐性の現状とそのメカニズム		

【目的】医療機関における重要課題の一つに、院内感染がある。院内感染の原因菌の中でも、MRSA のような多剤耐性菌は院内感染の主要な原因菌として位置づけられ、新しい抗生物質の開発が耐性菌の出現に追いついていない現状では大きな問題となっている。2000 年に米国で MRSA の新たな治療薬としてリネゾリドが承認されたが、承認から約 1 年後に耐性菌が出現し、2008 年にはスペインの Madrid にある病院でリネゾリド耐性黄色ブドウ球菌（LRSA）の集団感染が発生した。本研究では、リネゾリド耐性の現状及び耐性メカニズムについて知る事を目的として、上記の LRSA アウトブレイクについての調査を行った。

【方法】文献検索を行い、アウトブレイクの事例の論文を調査した。

【結果】リネゾリドは細菌性リボソームの 50S サブユニットの 23SrRNA の V 領域に結合し、リボソームにおける 30S‐mRNA・50S リボソーム・fMet‐tRNA によって構成される 70S 開始複合体の形成を阻害することによってタンパク質合成を阻害し、細菌の増殖を阻害する。リネゾリドに対する耐性メカニズムは 2 通り存在する。第 1 に、リネゾリドの標的である 23SrRNA の V 領域に存在する中心ループの塩基の変異によるもの、第 2 に、自然耐性遺伝子である *cfr* 遺伝子によるものである。*cfr* 遺伝子はクロラムフェニコールーフロルフェニコール耐性遺伝子であり、リネゾリドと交差耐性を示すことが知られている。LRSA の最初のアウトブレイクとして、2008 年 4 月 13 日～6 月 26 日の期間に、Madrid の 1000 床規模の病院の ICU で生じたものが報告された。LRSA 感染者 15 人のうち、6 人の患者が院内で死亡。うち 5 人は ICU で死亡したが、ICU で LRSA 感染が直接的な死亡原因と考えられたものは 2 例だった。 LRSA 全感染者 15 人から分離された菌の耐性メカニズムを確認するため、*cfr* 遺伝子を標的とした PCR を行い、アガロースゲル電気泳動でサイズを調べたところ、全て *cfr* 断片と適合する 746bp のバンドを示した。すなわち、15 例全例が *cfr* 遺伝子を有している事がわかった。さらに、23S rRNA の V 領域に変異があるかどうかを、23SrRNA 遺伝子の V 領域を nested PCR で増幅することにより調べたところ、23SrRNA の V 領域でも、他のヌクレオチドでも、変異は認められなかった。

【結論】今回の研究から、Madrid での LRSA アウトブレイクにおける LRSA の耐性機序が 23SrRNA の V 領域の変異によるものでなく、*cfr* 遺伝子によるものであることが明らかとなった。

【考察】リネゾリドに対する耐性は、患者間での耐性系統株の伝達と、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌による、クローン間の水平感染の 2 つの経路で広まった事が考えられ、LRSA のアウトブレイクの出現は、リネゾリドの使用頻度やコアグラーゼ陰性ブドウ球菌の存在等、複数の因子が組み合わさった事により起こったものと考えられる。

【参考文献】Clinical Outbreak of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit JAMA. 303:2260-2264（2010）

Resistance to Linezolid Is Mediated by the *cfr* Gene in the First Report of an Outbreak of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus*　*Clin Infect Dis*. 50:821-825 (2010).

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-055	氏　名	稲垣　孝規
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	*ycdT* 遺伝子導入大腸菌の増殖速度、バイオフィルム形成などの表現型変化		

【目的】近年、持続的感染や抗菌薬の透過性低下を生じさせる原因として細菌のバイオフィルム形成が注目を集めている。バイオフィルム形成には、c-di-GMP といわれるセカンドメッセンジャーによる菌体内濃度に応じた遺伝子発現が重要な役割を果たしている。しかし、その合成、分解に関わる酵素群は、大腸菌において 30 種類あると推定されており、それらの生理的役割はまだ詳細には明らかとなっていない。今回、di-guanylate cyclase 活性に重要な GGDEF ドメインをもつ、推定 c-di-GMP 合成酵素 *ycdT* に注目し、発現プラスミドを形質転換した大腸菌を用いて、*ycdT* 導入菌の表現型の変化を検討した。

【方法】大腸菌の染色体 DNA を鋳型として、PCR により *ycdT* を増幅させた後、pTrc99A 発現ベクターにクローニングした。pTrc99A は、本来の高いプロモーター活性を持つものと、低活性に改良した p206 型の 2 種類を使用した。得られたプラスミドを *Escherichia coli* TG1 株及び BW25113 株に形質転換した *ycdT* 過剰発現が期待される株を用いて野生株と表現型を比較した。表現型については、液体培地での菌の増殖速度、軟寒天培地を用いた運動性、バイオフィルム形成量の変化について検討した。さらに、*ycdT* 遺伝子の di-guanylate cyclase 活性を低下させると考えられる変異 *ycdT*(D353A)、*ycdT*(D353N)を導入したプラスミドを調製し、観察された表現型が確かに YcdT 酵素活性に起因しているかどうかを検討した。

【結果・考察】*ycdT* 遺伝子導入菌では、0.3%軟寒天培地での運動性が野生株と比べて約 1/5 と顕著に低下した。液体培地での増殖では、誘導期が野生株 80 分から *ycdT* 導入株で 130 分に延長した。対数増殖期中期で IPTG 誘導を行うと 2-3 時間の一時的な増殖停止の後に再増殖を開始した。また、前培養液の接種菌量の違いで誘導期の延長、IPTG 誘導での増殖の一時的な停止時間の程度に違いがあり、前培養液の接種菌量が少ないと増殖の一時的停止が観察できたが、前培養液の接種菌量が多いと増殖への影響が表れなかった。このことから前培養の条件の違いが、*ycdT* 導入による表現型の変化に影響を与えることがわかった。前培養液中に *ycdT* が一時的増殖を停止させる機能に影響を与える因子が存在していることを推定している。*ycdT* 遺伝子導入菌は、細胞内 c-di-GMP 濃度の上昇が期待され、細胞内 c-di-GMP 濃度が高いとバイオフィルムが増加すると予想された。しかし、予想に反して *ycdT* 導入株ではバイオフィルム形成量が約 2/3 に低下した。プラスミド上の *ycdT* 遺伝子の di-guanylate cyclase 活性を低下させる変異 *ycdT*(D353N)を導入した菌での表現型では、野生株と比べて差が見られなかった。このことから、野生型 *ycdT* 導入菌で観察された表現型が確かに YcdT 酵素活性に起因した結果であることが示唆された。

【結論】*ycdT* を過剰発現させることにより、発現量に応じて増殖の誘導期の延長、対数増殖期での一時的増殖の停止、バイオフィルムの形成量低下が生じることが示唆された。

【参考文献】Cyclic di-GMP as a second messenger Current Opinion in Microbiology 9:218–228 (2006)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-087	氏　名	原沢　和美
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	薬剤過敏症症候群―ウイルス性疾患とのつながり！？		

【目的】「Stevens-Johnson 症候群」や「中毒性表皮壊死症（TEN）」などと並ぶ重大薬疹の 1 つである「薬剤過敏症症候群（DIHS）」が、薬剤アレルギーとウイルス感染の両方によって引き起こされる複合的な病態であることが、近年明らかになった。今回私は調査研究として DIHS とウイルスとの関わりや、病態について詳細に調べた。

【方法】インターネットを利用した文献検索「J－STAGE」「CiNii」などを利用した。

【結果】《DIHS について》DIHS は高熱と臓器障害を伴う薬疹であり、薬剤投与中止後も遷延化し、多くの場合発症後 2～3 週間後にヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）の再活性化を生じるものとされている。主要所見としては①限定された薬剤投与後に遅発的に生じ、急速拡大する紅斑ができ、多くの場合紅皮症に移行する。②原因薬剤中止後も 2 週間以上遷延する。③38℃以上の発熱。④肝機能障害。⑤血液学的異常[白血球数増多（11000 mm^3 以上）、異常リンパ球の出現（5%以上）、好酸球増多（1500mm^3 以上）のうち 1 つ以上]⑥リンパ節腫脹⑦HHV-6 の再活性化が挙げられる。原因薬にはカルバマゼピン、アロプリノールなどがあり、DIHS の発生頻度は、原因医薬品を使用している 1,000 人～1 万人に 1 人と推定されている。

《DIHS と HHV-6》DIHS と HHV-6 の再活性化の関連性を調べるため、橋本らは、DIHS 患者 22 症例において蛍光抗体法による抗体価の測定を行った。その結果、全症例で発症後 2～4 週という限られた期間に著名な抗 HHV-6 抗体価の上昇がみられた。これより、DIHS における HHV-6 の再活性化は、DIHS の病態と密接に関わることが示唆された。また DIHS において HHV の再活性化がどのような役割を果たしているか明らかにするために、DIHS の原因薬剤を服用し、皮疹及び全身症状を伴う症例 100 例について、抗 HHV-6 IgG 抗体価の上昇した群（HHV-6 再活性化群）62 例と、抗 HHV-6 IgG 抗体価の上昇しなかった群（HHV-6 非再活性化）38 例に分類し、比較検討したところ、HHV-6 活性化群で発熱期間の延長、肝障害の重篤化、発熱、肝障害の再燃、予後の不良が見られた。

《DIHS とその他のヒトヘルペスウイルス》DIHS においてサイトメガロウイルスも HHV-6 の再活性化と同じあるいは、遅れた時期に再活性化される。臨床症状との関連も示唆されており、しばしば生命予後を決定することから、症状が遷延化する場合にサイトメガロウイルスの関与を疑う。EB ウイルス（HHV-4）と HHV-7 も再活性化を認められるが、臨床症状との関連は不明である。

《病態機序》DIHS の病態機序は詳細には明らかとなっていない。薬剤に対する過敏症が成立すると、CD4 陽性ヘルパーT 細胞や CD8 陽性キラーT 細胞のバーストが起こり、高サイトカイン血症が生じる。加えて、免疫低下といったホスト側の要因が働き、これまで潜伏していた HHV-6 の再活性化が生じ、HHV-6 を発現した細胞に対する強力な T 細胞性の免疫反応が誘導され、先行する薬物アレルギー性の発疹にウイルス性中毒疹が重なり、症状が遷延化するという考え方がある。

【考察・結論】重大薬疹の 1 つである DIHS は、HHV-6 の再活性化やサイトメガロウイルス、EB ウイルス、HHV-7 の再活性化などのウイルス感染症と密接な関わりを持っており、その病態機序を解明する事で、DIHS 治療効率の改善や生命予後の向上が期待できる。

【参考文献】橋本公二「薬剤性過敏症症候群とヒトヘルペス 6」モダンメディア 56:305-12（2010）

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-114	氏　名	黒多　俊介
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	カテーテルに起因する院内感染の予防策とガイドライン策定の現状		

【目的】院内感染の要因として輸液やカテーテルに起因した感染症が注目されてきている。病院だけでなく、薬局、ドラッグストアなどでも輸液の無菌調製などができるようになり、ますます、輸液やカテーテルに起因する感染症が注目されてくると予測される。このような状況下で薬剤師が、さらに積極的に感染症予防に関わっていくことが望ましい。そこで、今回、カテーテル感染症の予防ガイドラインを参考にしながら効果的な予防策をまとめることを目的とした。

【方法】インターネット上の医療機関等のサイトを用いて調査し、CDC ガイドライン、国立医科大ガイドラインを中心に予防策をまとめた。

【結果】カテーテル感染は主に中心静脈カテーテルを使用した際に発生リスクが高く、原因菌は主にコアグラーゼ陰性ブドウ球菌である。感染の生じる原因としては輸液自体の汚染、輸液システムからの微生物の侵入などの外因性要因、他の感染巣の存在、栄養障害・免疫機能低下に伴う内因性要因がある。予防において外因性要因に対する対策が効果的である。予防策として、可能な限り経腸栄養を使う、カテーテルを選択する際は必要最小限の内腔数、使用期間を考慮する、挿入時の操作として部位として鎖骨下静脈を選択、高度バリアプレコーションを用いる、消毒としてクロルヘキシジンかポピドンヨードを用いる、剃毛はなるべくしない、輸液を混合する際は可能な限り薬剤師の管理のもとで無菌環境で行う、挿入部の管理として消毒はクロルヘキシジン、ポピドンヨードを用いる、ドレッシング剤はガーゼ型またはフィルム型を用いる、輸液ラインの管理として可能な限り一対型を用いる、三方活栓は ICU や手術室以外では用いないなど予防策は様々であることが分かった。また、予防策をまとめるためにガイドラインを調査してみると日本国内で統一されたガイドラインが未だ策定されていなく、施設によってそれぞれのガイドラインを出している状況である。

【考察】外因性要因に対する対策として列挙した項目は医療人が熟知して注意して行えば出来る内容である。国内で統一ガイドラインが策定されていないが、施設の状況に応じた最良の方法が存在する点、国内のエビデンスデータが少ないという点等が影響していると考えられる。しかし、いくつかの施設のガイドラインを読むと予防策の方向性は共通だと考えられ、統一されたガイドラインが早く世に出ることを期待する。

【結論】感染は 100%なくすことは非常に困難だが、ガイドラインに沿った予防策を行えば減らすことは可能である。しかし、ガイドラインはあくまで予防方法の提案の一つに過ぎない。ガイドラインをよく熟知して患者の状態を見ながら根拠を持ち自分たちで最終的な判断をすることが重要と考える。

【参考文献】院内感染とカテーテル管理　ファルマシア 39:349~354 (2003)
血管内留置カテーテルに関連する感染予防の CDC ガイドライン(2002)
国立大学医学部附属病院対策協議会病院対策ガイドライン第二版 (2005)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-128	氏　名	冨岡　杏理
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	多剤耐性緑膿菌(MDRP)の耐性メカニズムと薬剤排出蛋白質		

【目的】多剤耐性緑膿菌(MDRP)は緑膿菌に対し強い抗菌活性が期待できるフルオロキノロン系抗菌薬(レボフロキサシンなど)、カルバペネム系抗菌薬(イミペネムなど)、および抗緑膿菌用アミノ配糖体系抗菌薬(アミカシンなど)の三系統の抗菌薬に耐性を獲得した緑膿菌と定義される。多剤耐性緑膿菌感染症に罹患すると有効な抗菌薬が殆ど存在しないため、治療が難渋し死亡例も報告されており臨床において大きな影響を与えている。そこで多剤耐性緑膿菌の耐性メカニズムと薬剤排出蛋白質について調査を行うこととした。

【方法】論文調査及びインターネットを利用した文献により調査をおこなった。

【結果】多剤耐性緑膿菌の耐性メカニズムは大きく分けて 2 通りの機構によって獲得される。1 つ目は内因性の耐性獲得機構であり、特定の抗菌薬を使用し続けることにより、細菌の遺伝子が変異し、耐性を獲得するというメカニズムである。2 つ目は獲得性の耐性獲得機構であり、耐性化していな緑膿菌が MDRP から伝達性のプラスミド等を介して耐性を獲得するというメカニズムである。

薬剤排出蛋白質について、海外での臨床における調査結果を得た。Kiser ら[1]は、University Teaching Hospital にて患者標品から 108 株の緑膿菌を分離し、そのうち 58 株が MDRP であり、残りの 50 株は non-MDRP であった。この MDRP 株の 64%、non-MDRP の 2%で薬剤排出系における外膜蛋白質 OprM の過剰発現が見られた。また、MDRP 株のうちの 64%で *mexR*、26%で *mexZ* の排出蛋白質発現調節に関わる遺伝子の変異が見られたが、OprM 過剰発現との相関はなかった。2 つ以上の組み合わせでは､薬剤排出系における外膜蛋白質遺伝子の OprJ の発現と OprM の過剰発現が同時に生じている株の 100%（8/8）が MDRP であった。また、*mexR* と *mexZ* が両方変異している株の 92%（12/13)、*nfxB* と *mexZ* が両方変異している株の 100%（5/5)、OprM 過剰発現と *mexZ* 変異が両方生じている株の 100%（16/16）は MDRP であった。次に、Maniati ら[2]が、ギリシャの患者から検出した緑膿菌は高レベルのカルバペネム耐性(イミペネム MIC 512μg/mL､メロペネム MIC 128μg/mL)を示していた。この緑膿菌はβ-ラクタマーゼ(*VIM-4,OXM-35* 型)の発現が認められた。さらに、外膜のポーリンの欠損や、MexAB-OprM と MexXY-OprM の過剰発現が認められた。

【考察】緑膿菌が薬剤耐性を獲得する際には、様々な遺伝子変異が生じ、また、複数の型の耐性機序が出現する事により臨床において治療を難渋させていると考えられた。

【結論】薬剤耐性のメカニズムや排出蛋白質についてはまだ解明されていない点が多い。昨年、帝京大学附属病院での薬剤耐性菌が話題になったが、臨床において耐性菌の増加は大きな問題を生んでいる。薬剤師として、細菌の耐性獲得を防ぐような適正な抗菌薬の使用が必須であると思う。

【参考文献】

(1) Efflux Pump Contribution to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy　60:132-135(2010)

(2) A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel bla_{VIM-4}/bla_{P1b} integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD.　Pharmacotherapy 30:632-638 (2010)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-136	氏　名	二又　美智子
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	増殖条件変化による薬剤排出蛋白質の大腸菌膜上での局在		

【目的】　MacAB-TolC システムは大腸菌で過剰発現させることでエリスロマイシン耐性を与えることから細菌の薬剤感受性に関与し、14、15 員環マクロライドの菌体内から菌体外への排出を担うと考えられている蛋白質である。当研究室で、MacB が大腸菌の極に局在していることを発見したが、全ての菌に極局在が見られた訳ではなかった。そこで、MacB 局在の仕組みを明らかにすることを目的として、菌株の違い・培養時間の違いによって緑色蛍光蛋白質(GFP)を融合した MacB の局在がどのように変化するのかを顕微鏡によって観察した。

【方法】　大腸菌の①TG1/pTH2023、②BW25113/pTH2023 株では、薬剤排出蛋白質としての働きを保持しながら、MacB に GFP を融合させた蛋白質を発現している。コントロールとして GFP だけを発現させた株、③TG1/pTH1001 株も使用した。菌を振盪培養器(速度 150 r/min)で培養し、対数増殖期前期(50 分)、中期(110 分)、後期(170 分)、定常期(240 分)で菌液を採取し、顕微鏡で GFP の蛍光を指標として MacB の局在を観察した。

【結果】　大腸菌③はほとんど GFP 発光の局在は見られなかった。しかし 50 分培養させた菌液を顕微鏡で観察したところ、極局在する菌が一部に認められた。発光を示す多くの菌で、全体に強い発光を示していた。大腸菌①では、ほとんどの菌が極局在を示していた。又、③より発光の程度は弱かった。50 分では菌全体がぼんやりと発光し、その中で極局在が確認できた。110 分では 50 分の菌の状態と類似しており、菌が全体的にぼんやりと発光し、極局在している部分がより強く発光している状態だった。170 分では極に局在して発光しているものと、ぼんやりと全体が発光しているものの両方が観察された。興味深いことに定常期 240 分では大腸菌膜上でドット状に局在している状態の菌が観察された。大腸菌②では、発光の局在は見られず、大腸菌の全体が薄くぼんやりと発光していた。

【考察】　大腸菌③ではプロモーターに結合させただけの GFP なので、局在はしないものと当初考えていたが、顕微鏡で観察した中では局在をする菌がわずかながら存在していた。大腸菌②では、発光量が非常に小さく、GFP-MacB が発現していない又は発現量が非常に低いものであると考えられた。増殖濁度測定の結果から、大腸菌②が他の①、③と比べて菌数として増殖能が低いことはなく、菌株の違いが蛋白質の発現に影響しているものと考えられた。大腸菌①において、増殖相の早い段階で MacB の極局在が高い割合で観察され、定常期に向かうにしたがって、大腸菌膜上でドット状に局在した。その局在には規則性が感じられる局在をしており、興味深いものだった。

【結論】　増殖相の違いにより GFP-MacB の局在に変化があることが分かったが、規則的なことを結論づけるまでには至っていない。同手法でさらに多くのデータを解析し、局在の傾向・特徴を掴む必要がある。

【参考文献】　大腸菌マクロライド排出蛋白質の膜局在　　第 31 回「生体膜と薬物の相互作用シンポジウム」講演要旨集　35-36 (2009)　ISBN 0919-2131

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-164	氏　名	小林　あやの
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	細胞内 c-di-GMP 量を調節する *yegE* 遺伝子の PCR 増幅と発現ベクターへのクローニング		

【目的】ヒトにおける歯周病、慢性呼吸器系疾患、カテーテル留置による尿路感染症の発症はバイオフィルムが深く関与している。バイオフィルム形成には cyclic-di-GMP(c-di-GMP)というセカンドメッセンジャーが関与している。c-di-GMP 合成には GGDEF ドメインを持つ酵素が関与しており、c-di-GMP を合成し細胞内 c-di-GMP 濃度が高くなるとバイオフィルムを形成しやすくなると考えられている。逆に c-di-GMP 分解は EAL ドメインを持つ酵素が関与しており、c-di-GMP 濃度が低くなるとバイオフィルムを形成しにくくなる。私は GGDEF ドメインと EAL ドメインの両方を持つ膜貫通型タンパク質である YegE に注目して研究を行った。このタンパク質を過剰発現させた大腸菌のバイオフィルム形成の変化を調べる目的で PCR による *yegE* 遺伝子の増幅、*yegE* 遺伝子の pTrc99A、プロモーター活性を低下させた pTrc99A(p206)へのクローニングを行った。

【方法】*yegE* 遺伝子増幅のための鋳型 DNA として *E.coli* TG1 株を使用した。PCR 酵素は Prime STAR（TAKARA）を使用した。シークエンスは両側鎖のプライマーを設計し、プラスミド（TOPO/*yegE*）プライマーを混合したサンプルを調整しバイオマトリックス・シークエンス社に依頼した。塩基配列解析は PEC Profiling *E.coli* Cromosome Ver.4 Gene-Fasta Format の配列データを基準にして GENTYX 塩基配列解析ソフトウェアを使用した。

【結果】PCR での *yegE* 遺伝子の増幅条件として、DNA 変性（98℃、60ｓ）、アニーリング（55℃、5ｓ）、DNA 合成（70℃、3.5min）30 サイクルで PCR を行ったが、*yegE* 遺伝子として期待されるサイズの DNA バンドの増幅は見られなかった。次にアニーリング時間を 5s から 15s に延長したところ、*yegE* 遺伝子と考えられる 3kb の断片が単一なバンドとして増幅された。増幅した *yegE* 遺伝子を切り出した後 TOPO ベクターにライゲーション（TOPO/*yegE*）した後、制限酵素（*EcoR*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Nco*Ⅰ）で切断し *yegE* 遺伝子の組み込みを切断パターンで確認した。さらに、DNA の塩基配列決定を行い、データベース上の塩基配列データと増幅した *yegE* 遺伝子の塩基配列が完全一致していることを確認した。TOPO ベクターに組み込んである *yegE* 遺伝子を pTrc99A、pTrc99A(p206)へクローニングするために TOPO/*yegE* を制限酵素 *EcoR*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Sma*Ⅰ で、pTrc99A、pTrc99A(p206)を制限酵素 *EcoR*Ⅰ、*Xba*Ⅰ で切断した。*yegE* 遺伝子と TOPO ベクターはそれぞれ 3318bp、3500bp なので電気泳動でそれぞれのバンドの位置が近いためベクター側 DNA をさらに *Sma*Ⅰ で切断することで *yegE* 遺伝子の 3318bp のバンドの切り出しを容易にした。*yegE* 遺伝子を切り出し後、弱いプロモーター活性を持つ pTrc99A(p206)の発現ベクターへの組み換えた。pTrc99A への組み込みを完了することで膜貫通型タンパク質 YegE を過剰発現させ表現型を調べる系を可能にする。

【考察】膜貫通型タンパク質 YegE を過剰発現した大腸菌を作成する準備を整えた。得られた大腸菌を使い、バイオフィルムアッセイ、増殖曲線、運動性を調べることで YegE タンパク質の大腸菌での生理的役割を推定できることを期待したい。

【参考文献】Cyclic di-GMP as a second messenger Current Opinion in Microbiology 9:218–228 (2006)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-185	氏　名	宮崎　裕典
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	緑膿菌バイオフィルムが関連するびまん性汎細気管支炎(DPB)とマクロライド系抗菌薬の治療		

【目的】びまん性汎細気管支炎(以下 DPB)は 1969 年に本間，山中らによって臨床病理学的に独立した疾患として提唱され、両肺細気管支領域の慢性炎症から咳、痰、労作時の息切れを主症状とし、細気管支の閉塞をきたし予後不良となる疾患である。DPB は緑膿菌が関与するバイオフィルム関連疾患として、細菌間の情報伝達系であるクオラムセンシング(以下 QS)の発現が報告されている。治療には、マクロライド系抗菌薬の少量長期投与が行われるが緑膿菌に抗菌活性を示さないにも関わらず DPB に対し有効な治療薬となることから何故予後を改善するのか興味深い。今回マクロライド系抗菌薬が QS の機能や薬剤排出タンパク質発現に与える影響についてまとめ、有効性に関わる作用機序を考えるとともに感染症治療の展望について考察した。

【方法】論文検索は NCBI 等の各種データベースを調査した。

【結果】緑膿菌はオートインデューサー(AI)と呼ばれる低分子化合物と AI に対する受容体を産生し、その複合体は遺伝子発現に関与することが知られており、病原因子の産生、バイオフィルム形成に関わるアルギン酸産生を誘導する。QS による制御によって薬剤排出ポンプ MexAB-OprM が発現誘導されるとの報告もあり、病原因子の放出を介して DPB の病態形成に関わっている可能性がある。C_4-HSL が MexR レギュレーターを直接活性化するかどうかについては未だ明かではない。一方、AI 産生に伴いバイオフィルムが形成されると抗菌薬の透過性低下、生体防御機構からのエスケープが起こると報告されている。また、AI は宿主細胞にも作用し IL-8、IL12、TNF-α の産生にも関与している。アジスロマイシン(AZI)はタンパク合成阻害のみならず抗菌活性とは異なる機序によって AI 合成酵素阻害、アルギネート合成酵素阻害、緑膿菌膜上に発現する MexAB-OprM の発現低下作用がある。また、詳しい作用機序は不明だが AZI が MexAB-OprM の発現低下作用により、おそらく病原因子の排出低下から感染力が低下し、また AI 排出に伴うサイトカイン依存性の炎症も抑制されると考えられる。

【考察】緑膿菌に対するマクロライド系抗菌薬の MIC 値は 100μg/ml 以上と高く、血中濃度の維持は困難で臨床的に無効な抗菌薬と考えられる。しかし低濃度で QS、薬剤排出ポンプへの作用を介し、DPB 患者の予後改善に関わっていることが推測される。

【結論】マクロライド系抗菌薬が、DPB の予後改善に関して、緑膿菌の生理的機能に影響を与え、抗菌活性とは異なる機序で有効に作用していると考えられた。

【参考文献】マクロライド剤及びその誘導体の緑膿菌 quorum-sensing 機構に対する抑制効果に関する研究　The Japanese Journal of Antibiotics　56: 81-86 (2003)

Macrolide antibiotic-mediated downregulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* Anitimicrob. Agents Chemother., 52: 4141–4144 (2008)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-186	氏　名	森　崇
所属研究室	生体防御学研究室		
研究テーマ	β-ラクタマーゼ阻害剤の現状とβ-ラクタム剤との配合比変化		

【目的】2008 年 9 月に承認された「ゾシン」は、β-ラクタマーゼ阻害剤のタゾバクタム(TAZ)とペニシリン系抗菌薬のピペラシリン(PIPC)を配合した薬剤であるが、2001 年 4 月に承認された「タゾシン」が、力価比で TAZ/PIPC（1:4）であるのに対して、「ゾシン」は、TAZ/PIPC（1:8）の新規抗菌薬であり、重症・難治性感染症治療の選択薬の一つとして注目を集めている。今回 TAZ/PIPC(1:8)への配合比変更により、重症・難治性感染症のβ-ラクタマーゼ産生菌に対する「ゾシン」の有効性を知るため、各種疾患に対するβ-ラクタマーゼ産生菌の臨床効果及び細菌学的効果について「日本化学療法会学会新薬シンポジウム」への報告にもとづいて調査を行った。

【方法】TAZ/PIPC（1:8）の「市中肺炎」におけるセフタジジム (CAZ)対照第Ⅲ相試験、「複雑性尿路感染症」「敗血症および感染性心内膜炎」「小児細菌感染症」に対する第Ⅲ相試験のβ-ラクタマーゼ産生菌における有効性に注目した。各種疾患のβ-ラクタマーゼ産生菌の原因菌別臨床効果は、「有効」「無効」の 2 段階で評価され、細菌学的効果は、「消失（推定消失）」「減少または一部消失」「存続」の 3 段階で評価されていた。

【結果】β-ラクタマーゼ産生菌感染症に対する TAZ/PIPC（1:8）投与の結果、原因菌別臨床効果として「市中肺炎」では、投与終了時、投与後 7 日後共に 5 例中 4 例が「有効」であった。「複雑性尿路感染症」では、47 例中 46 例、「敗血症及び感染性心内膜症」では、3 例全例、「小児細菌感染症」では、17 例全例が「有効」であった。また、細菌学的効果では、「市中肺炎」では、投与終了時、投与後 7 日後共に 6 株全株が「消失」であった。「複雑性尿路感染症」では、53 株中 51 株、「敗血症及び感染性心内膜症」では、3 株全株、「小児細菌感染症」では、16 株全株「消失」であった。β-ラクタマーゼ産生菌に対し TAZ/PIPC（1:4）投与の結果、「複雑性尿路感染症」では、原因菌別臨床効果は、40 例中 32 例が「有効」、細胞学的効果では、49 株中 45 株が「消失」であった。

【考察】TAZ/PIPC（1:8）は、呼吸器感染症のβ-ラクタマーゼ産生菌に対して「市中肺炎」では、菌全消失し、臨床でも効果があることが明らかになった。「小児細菌感染症」でも細菌性肺炎に対して菌全消失し、臨床でも腎盂腎炎・複雑性膀胱炎を除いた 12 例全て「有効」であった。これらのことより呼吸器感染症に対しての治療薬として有用であると考えられる。また、TAZ/PIPC(1:4)ですでに適応のあった「複雑性尿路感染症」「敗血症」に関しても「敗血症」ではβ-ラクタマーゼ産生菌全株が「消失」、全例臨床効果「有効」であり、「複雑性尿路感染症」も *E. coli*　2 株のみ「存続」の 96.2%菌消失で、臨床効果も 97.9%であった。TAZ/PIPC(1:4)では、菌消失率が 91.8%、臨床有効率 80.0%であったので TAZ/PIPC(1:8)として PIPC の力価を増量することで顕著に有効性を示すことが明らかになった。

【結論】第 3 世代以降のセフェム系抗菌薬やカルバペネム系抗菌薬が使用される重症・難治性を含む中等症以上の肺炎では新たな感染症治療薬としての選択肢を増すことで、これらの薬剤の使用量を減らすことにより耐性菌出現の抑制に貢献が期待できると考えられる。また「複雑性尿路感染症」「敗血症」に対しても TAZ/PIPC　(1:4) と同等以上の抗菌効果が期待できることが示唆された。

【参考文献】日本化学療法学会雑誌 *58* (S-1) :29-102　(2010)

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-006	氏　名	石川　恵理子
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	マウス食道におけるバイニロイド受容体 TRPV1 の局在と逆流性食道炎病態における変化		

【目的】Transient Receptor Potencial Vanilloid 1（TRPV1）は知覚神経上に発現し、酸による痛みの伝達に重要な役割を果たしている。胃食道逆流症（GERD）は胃酸が食道内に逆流することにより生じる疾患で、症状は、主に胸やけ、胸痛などがある。GERD の原因は、下部食道括約筋（LES）の機能不全により胃酸が逆流し停滞することで食道粘膜に炎症が現れると考えられている。そのため、食道における GERD の病態に酸性条件下で活性化される TRPV1 が大きく関与しているだろうと仮説を立てた。本研究では、マウス LES における TRPV1 を始めその機能に関与すると考えられる様々な伝達物質の局在と GERD における TRPV1 の関与を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】C57BL/6 系雄性マウスの胃食道結合部位を摘出後、固定、包埋した。凍結組織切片を作成後、TRPV1 は一次抗体の抗 TRPV1 抗体とインキュベートし、ABC 法とタイラマイドーフルオレッセインにて蛍光染色した。他の染色（caltitonin gene related peptide（CGRP）、substance P（SP）、vesicular acetylcholine transporter（VAChT）、neuronal nitric oxide synthase（ｎNOS））は、各一次抗体とインキュベートし、二次抗体を用いて蛍光染色し共焦点顕微鏡で観察した。GERD モデルはマウスを吸入麻酔下で開腹し、幽門部及び前胃と胃体部の境界部の 2 箇所を結紮し、開腹部を縫合した。その後 1.5 あるいは 3 時間放置して作成した。

【結果・考察】マウス食道における TRPV1 発現神経の局在を観察したところ、胃食道結合部位の粘膜下と筋間神経叢に多く発現していることが明らかになった。神経細胞体における局在が確認されなかったことから外来性の神経であることが示唆された。本研究では TRPV1 の多く発現している粘膜と筋間神経叢に注目し検討を行った。まず神経ペプチドである CGRP との二重染色を行った。CGRP 免疫活性は粘膜下と筋間神経叢でほぼ完全に TRPV1 免疫活性と一致した。次に、興奮性の神経伝達物質である ＳＰとの二重染色を行った。ＳＰ免疫活性は粘膜下と筋層に観察され、筋間神経叢では細胞体と軸索が観察された。二重染色の結果、粘膜下と筋間神経叢の神経軸索上で TRPV1 は SP と一部共存していた。これらのことから TRPV1 は脊髄由来の神経に発現しており、その活性化に伴い SP の遊離が生じることで、運動機能や痛みの伝達といった生理機能へ関与することが推察された。続いて、NO 合成酵素であるｎNOS と TRPV1 の二重染色を行った。ｎNOS 免疫活性は筋層で観察されたが、粘膜下ではほとんど観察されなかった。筋間神経叢において細胞体と軸索も観察された。二重染色の結果、筋間神経叢の神経軸索上で一部共存していた。よって TRPV1 の活性化により NO が遊離されて平滑筋弛緩反応が惹起されることが示唆された。最後に、VAChT との二重染色を行った。TRPV1 と VAChT の二重染色は困難であったため、CGRP を TRPV1 の代用して行った。VAChT 免疫活性は粘膜下と筋層に観察された。二重染色の結果、CGRP と VAChT は粘膜下で共存していた。よって、迷走神経由来の神経にも TRPV1 が発現していることが示唆された。GERD モデルと生理的条件下の比較においては、GERD モデルで TRPV1 神経線維は粘膜下で増加する傾向が見られ、筋層では変化が見られなかった。

【結論】本研究から食道の TRPV1 神経は迷走神経と脊髄神経由来の外来性神経で、主に粘膜下、筋間神経叢に投射しており、CGRP、NO、SP、ACh などがその機能に関与していることが示唆された。今後 GERD との関連性をさらに検討する。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-017	氏　名	木地山　健太
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	炎症性腸疾患モデルにおける直腸バニロイド受容体 TRPV1 の発現変化 ：TRPV1 発現細胞の解析		

【目的】炎症性腸疾患には潰瘍性大腸炎やクローン病があり、近年患者数が増加している。しかしながら、病態の根本的なメカニズムは完全に解明されてはいない。腸疾患の疼痛発生に、温度感受性受容体 transient receptor potential vanilloid receptor subtype1（TRPV1）が関わっている事を示唆する多くの報告があるが、炎症性腸疾患における TRPV1 の発現変化については、まだ明らかにされていない。そこで本研究では、マウスの炎症性腸疾患モデルを作成し、内臓痛覚と TRPV1 発現神経と内臓痛との関連、そして 2 重染色法によって TRPV1 発現非神経細胞の解析を行った。

【方法】マウスに 3%デキストラン硫酸（DSS 3%）を 4 日間、7 日間、自由飲水させ、炎症性腸疾患モデルを作成した。内臓痛覚の評価はバロスタット法により、15-60mmHg の各バルーン圧に対する筋収縮反応を測定することで行った。DSS 無処置、4 日間、7 日間処置群のマウスより直腸を摘出した後、固定し凍結切片を作成した。免疫染色は、抗 TRPV1 抗体を使い ABC 法とタイラマイドシグナル増幅法を組み合わせ検出した。TRPV1 と 5-HT、keratin、TNF-α、substance P (SP)との二重染色は、TRPV1 染色後、抗 5-HT、抗 keratin、抗 TNF-α 抗体と共にインキュベートし、各種二次抗体を用いて蛍光染色を行った。5-HT と SP の二重染色は 5-HT 染色後、抗 SP 抗体を用いて蛍光染色を行った。観察は共焦点顕微鏡(OLYMPUS FV1000)で行った。

【結果・考察】内臓痛覚は、正常動物群と比べ DSS 処置群では各バルーン圧に対して筋収縮反応が増大された。また、DSS 処置による内臓痛覚過敏は、TRPV1 アンタゴニストである BCTC 投与によって抑制された。免疫染色の結果から、正常動物群と比較すると、DSS 処置群では有意に TRPV1 の発現増加がみられた。これらのことから、炎症性腸疾患の内臓痛における TRPV1 の関与が示唆された。また、興味深いことに DSS 7 日間処置群において神経のみならず、粘膜の非神経細胞にも TRPV1 の発現が観察された。そこで非神経細胞に注目し、非神経性の TRPV1 と 5-HT、SP の二重染色をした結果、TRPV1 は 5-HT、SP との共存はしなかったが、TRPV1 神経の近傍に 5-HT と SP 免疫陽性細胞が存在していた。5-HT と SP の二重染色では、5-HT 陽性細胞と SP 陽性細胞はほぼ完全に一致した。よって、5-HT と SP 共発現細胞は上皮性の TRPV1 増感作に関与していると考えられた。TRPV1 と上皮マーカの keratin の二重染色では、共存部位と非共存部位が確認された。よって、増加した非神経性の TRPV1 は上皮性と非上皮性の両方で発現している事が考えられる。TRPV1 と TNF-α の二重染色において、粘膜固有層に共存している部分がみられた。TNF-α の産生に非上皮性の TRPV1 活性が関与している可能性があると考えられる。

【結論】炎症性腸疾患モデルの直腸において TRPV1 発現神経だけでなく非神経細胞にも発現量が増加している事が明らかとなった。上皮より遊離される 5-HT、SP により TRPV1 が増感作することが示唆された。粘膜固有層に発現している非神経性 TRPV1 と TNF-α 陽性細胞の共存から、TRPV1 の活性化は TNF-α の産生に関与していることが示唆された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-078	氏　名	髙垣　秋郎
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	カプサイシンによる胃運動の亢進作用：覚醒下マウス ^{13}C-酢酸法による検討		

【目的】胃運動の異常は、近年注目されている機能性胃腸症など消化器疾患に関与することが知られている。また、健常人を対象として十二指腸に塩酸を注入した場合、上腹部症状が出現することが報告され、胃運動機能調節に対する胃酸の関与が考えられた。胃管腔内酸感知システムとして内臓知覚神経上にあるバニロイド受容体 TRPV1 が考えられるが、この受容体と胃運動との関連はまだ明らかにされていない。そこで本研究では、TRPV1 活性化因子である胃酸の分泌抑制を行ったとき、およびトウガラシ辛味成分カプサイシンを投与したときの、胃運動での変化を覚醒下マウス呼気テスト法を用いて検討した。

【方法】動物は、雄性 ddY 系マウス週齢 6～9 週のものを使用した。胃運動は、覚醒下で非侵襲的かつ経時的に解析できる ^{13}C 呼気テスト法を用いた。^{13}C 標識化合物として、本研究では ^{13}C 標識酢酸（64 mg/kg）を経口投与した。^{13}C 酢酸は十二指腸で吸収、肝代謝されたのちに $^{13}CO_2$ として呼気中に排泄される。この $^{13}CO_2$ 濃度を測定することで胃運動の評価を行った。呼気採取時間は 90 分とし、酢酸投与後 5 分間隔でマウスの呼気を採取した。赤外吸光にて標準サンプルと採取した呼気中の ^{13}C 濃度を測定した。標準サンプルとして混合ガス（95 % O_2、5 % CO_2）を使用した。使用薬物は、プロトンポンプ阻害薬オメプラゾール（60 mg/kg）を実験開始 30、60、および 120 分前に、TRPV1 作動薬カプサイシン（0.03~3.0 mg/kg）を実験開始 30 分前にそれぞれ皮下投与した。また、ヒトでのトウガラシ摂取を考え、カプサイシン（0.03~30 mg/kg）を実験開始 30 分前に経口投与した。

【結果・考察】正常マウスでは、実験開始後 25 分から 30 分ほどで $^{13}CO_2$ 濃度のピークを観察した。オメプラゾール処置による胃酸分泌抑制時の $^{13}CO_2$ 濃度は、処置時間によらず、対照群と明らかな変化が認められなかった。したがって胃酸抑制と胃運動の間に関連性がないことが示唆された。カプサイシン皮下投与による胃運動変化では、0.03 mg/kg で $^{13}CO_2$ 濃度に有意な亢進が認められた。しかし、0.3 mg/kg ではその亢進作用が消失し、3.0 mg/kg では逆に $^{13}CO_2$ 濃度の低下が観察された。カプサイシン経口投与では、1.0 mg/kg 以下で対照群と有意な変化は認められず、3.0 mg/kg で胃運動の明らかな亢進が見られ、10 mg/kg 以上ではその亢進作用が消失した。皮下および経口投与共に用量依存性に亢進が見られた後、高用量で低下が起こるベルシェイプ型の薬理反応が観察された。

【結論】TRPV1 活性化因子である胃酸の分泌抑制状態では、胃運動は影響を受けないことが明らかになった。そこで、胃酸分泌亢進下での胃運動についても検討を行う必要がある。また、カプサイシンはある用量まで胃運動を亢進したのち、用量を増やすと胃運動抑制に転ずるベルシェイプ型の薬理作用を示すことが示唆された。したがって、今後 TRPV1 受容体拮抗薬を用い、胃運動と TRPV1 受容体の関連についても明らかにする必要がある。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-082	氏　名	永井　将義
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	マウス摘出結腸標本におけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネート誘起消化管平滑筋収縮反応の薬理学的解析－ワサビ受容体 TRPA1 の役割－		

【目的】ワサビ受容体 TRPA1 は、ワサビの辛味成分アリルイソチオシアネートによって活性化されるイオンチャネル内蔵型受容体である。TRPA1 は内臓一次知覚神経にも発現し、TRPV1 発現神経に TRPA1 が一部共発現していることが報告されている。近年、消化管領域において、ストレス性胃腸障害の発症にかかわるターゲット分子として TRPV1 発現神経の消化管運動機能への作用が明らかにされてきている。しかし、同じ侵害受容器に分類される TRPA1 の消化管運動機能への影響については、依然不明な点が多く残されている。最近、我々の研究室においてアリルイソチオシアネートが、マウス摘出遠位結腸において縦走筋方向への一過性収縮を引き起こすことを見出した。また、その収縮反応は抗コリン薬であるアトロピン（1 μM ）によって顕著に抑制されたが、完全ではなかった。このことより、アリルイソチオシアネートによる収縮反応は、アセチルコリン以外の神経伝達物質も介在していることが推察された。そこで本研究では、マウス摘出遠位結腸標本を用い、TRPA1 活性化薬アリルイソチオシアネートの平滑筋収縮作用メカニズムを明らかにするために、薬理学的解析を行った。

【方法】雄性ddY系マウス（23～40 g）より遠位結腸を摘出し標本とした。摘出標本は、38℃保湿槽内で95%O_2-5%CO_2の混合ガスを通気し、栄養液を満たした臓器槽内に支持棒を用いて懸架した。摘出標本に対するアリルイソチオシアネートによる運動性の検討は、等張性トランスデューサーを用いて摘出標本の縦走筋方向への平滑筋張力を記録することで行った。また、アセチルコリン（10 μM）の収縮高を100%としてアリルイソチオシアネートによる収縮張力を評価した。

【結果・考察】マウス摘出遠位結腸標本において、アリルイソチオシアネート（100 μM）の適用は、一過性の収縮反応を引き起こし、その値はおよそ 40%であった。アリルイソチオシアネートによる収縮反応は、TRPA1 受容体拮抗薬 HC030031（30 μM）の前処置により顕著に抑制された。また、その反応は、NK1 受容体拮抗薬 FK888（10 μM）および NK2 受容体拮抗薬 GR159897（3 μM）の前処置によっても顕著に抑制された。アリルイソチオシアネートによる収縮反応に抑制性メディエーターである内因性 NO が関与するかどうかを同定するために、非選択的 NO 合成酵素阻害薬 L-NAME（100 μM）を用いて検討した。しかし、アリルイソチオシアネートによる収縮反応は、非選択的 NO 合成酵素阻害薬 L-NAME（100 μM）の前処置により何ら影響を受けなかった。

【結論】マウス摘出遠位結腸標本において、アリルイソチオシアネートの収縮は、ワサビ受容体 TRPA1 を介する反応であることが判明した。また、その反応は NK1 受容体および NK2 受容体をも介することが明らかとなった。一方、抑制性メディエーターである内因性 NO の関与はほとんどないことが判明した。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	ＰＣ2006-107	氏　名	大曽根　健矢
所属講座	薬理学講座		
研究テーマ	麻酔下ラット胃粘膜におけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネート誘起血流増大および血管透過性亢進の作用機序解析		

【目的】ワサビは古くから健胃薬や食欲増進薬として広く知られている。また、ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートは、温度感受性 TRP チャネルである TRPA1 を活性化することが近年報告されている。本研究室では、アリルイソチオシアネート(30-300 mM) の胃内適用により酸の胃粘膜浸潤を伴う胃血流増大反応を見出している。一方、カプサイシン感受性一次知覚神経機能麻痺ラットにおいて、アリルイソチオシアネート(300 mM) を胃内適用すると胃血流の増大が消失し、肉眼的損傷が形成されることも見出している。従って、アリルイソチオシアネートは胃粘膜血流を増大させることにより、胃粘膜を保護することが示唆された。本研究では、酸の消失量増大が起きなかったアリルイソチオシアネート(10 mM 以下) による血管透過性亢進および胃粘膜血流増大が知覚神経上の TRPA1 を介しているのかについて検討を行った。

【方法】雄性 SD 系ラット (6-8 週齢)は、オメプラゾール (60 mg/kg, i.p.)を処置後、ウレタン (1.25 g/kg, i.p.) 麻酔下に上腹部を正中切開し、胃と十二指腸を露呈し幽門結紮した。その後胃前部より大彎に沿って胃を切開し、ex-vivo チェンバーに装着させた。胃粘膜血流はレーザードップラー血流計で測定した。血管透過性亢進はラット尾静脈よりポンタミンスカイブルー (2 mg/kg, i.v.) を投与し、胃管腔内に漏出されたポンタミンスカイブルーの量を吸光度測定(950 nm) して算出した。TRPA1 拮抗薬 HC-030031 (28.16 mM) は、アリルイソチオシアネート適用 20 分前に胃管腔内適用し検討を行った。

【結果・考察】アリルイソチオシアネート (0.33 -30 mM) 胃内適用 (50 mM 塩酸存在下) は、胃粘膜血流を用量依存的に増大させた。アリルイソチオシアネート (10 mM) を 3 回繰り返し適用すると、血流増大の程度は徐々に低下した。TRPA1 拮抗薬 HC-030031 の前処置は、アリルイソチオシアネート (10 mM) による胃血流増大反応を顕著に抑制した。この結果より、アリルイソチオシアネートは知覚神経の TRPA1 に作用して胃粘膜血流を増大することが示唆された。アリルイソチオシアネート胃内適用から 120 分間の血管透過性についても用量依存的な亢進が見られた。また、酸あるいは生理食塩水含有チェンバーでのアリルイソチオシアネート (30 mM)の反応を比較した結果、酸存在下では血管透過性をより亢進させた。酸は TRPV1 を活性化することが知られているため、TRPV1 の活性化によりアリルイソチオシアネート誘起血管透過性亢進をさらに増大させたと考えられる。なお、TRPA1 拮抗薬存在下における血管透過性の検討は投与経路などの影響によりデータが出せなかったため今後の検討課題として残っている。

【結論】ワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートが胃に作用すると胃粘膜血流増大および血管透過性亢進を引き起こすことを見出した。また、胃粘膜血流増大は知覚神経上の TRPA1 を介して生じることが示唆された。ワサビは胃において血管透過性亢進を引き起こすが、胃粘膜血流を増大させることで胃粘膜を保護するため、健胃薬として用いられると考えられる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-145	氏　名	青木　遼平
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	オピオイド鎮痛薬による便秘作用の効力比較：マグヌス法およびビーズ法を用いた検討		

研究概要

【目的】オピオイド鎮痛薬による便秘は、副作用として最も高頻度に発現し、鎮痛用量よりもはるかに低用量で発現することが知られている。オピオイド鎮痛薬間では、フェンタニル、オキシコドンはモルヒネより便秘が生じにくいとされている。しかし、これらオピオイド鎮痛薬の便秘に関して、効力比較や大腸におけるメカニズムはあまり検討がされていない。そこで今回、オピオイド鎮痛薬の便秘作用の効力を薬理学的に解析することを目的として、モルヒネ、フェンタニルおよびオキシコドンに関して、マウス・マグヌス法、ビーズ法を用いて便秘につながる消化管運動の抑制作用を比較検討した。マグヌス法の検討では、摘出マウス下部消化管標本における輪状筋収縮作用の効力を検討した。また、ビーズ法の検討では、マウス個体を用いて遠位結腸～直腸における消化管運動抑制作用の効力について検討を行った。

【方法】ddY 系雄性マウスの下部消化菅を摘出し、直腸・遠位結腸・横行結腸・回腸をそれぞれ部位に分けて標本とした。摘出標本は 38 度保温槽内で、95%O_2—5%CO_2 の混合ガスを通気し、栄養液を満たしたマグヌス装置に装着し、標本の平滑筋収縮反応を輪状筋方向に記録した。ビーズ法は ddY 系雄性マウスにオピオイド鎮痛薬をそれぞれ皮下注射し、15 分後にビーズを肛門から 2cm の場所に挿入して、ビーズが排泄されるまでの時間を測定した。さらにナロキソン（2mg/kg）、ナロキソンメチオダイト（3mg/kg）、β - フナルトレキサミン（β-FNA，40mg/kg）を、モルヒネ投与のそれぞれ 15 分、15 分、24 時間前に皮下注射しビーズ排泄時間の変化を測定した。

【結果】摘出マウス下部消化菅標本を用いて、輪状筋張力に対するモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンの作用を検討した。各薬物は直腸、遠位結腸、横行結腸、回腸の各部位に対して用量依存的な収縮作用を引き起こした。各部位に対する作用の比較から肛門に近い直腸、遠位結腸で特に強い平滑筋収縮作用を示すことが明らかとなった。次にビーズ法において in vivo における大腸運動に対する作用を検討した。その結果、各薬物は用量依存的な大腸運動抑制作用を示し、モルヒネはオキシコドンと比べ大腸性便秘作用が強いことが判明した。次に大腸運動抑制作用における作用機序の検討を行った。まず、オピオイド受容体拮抗薬ナロキソンを前投与したところ、モルヒネ（3mg/kg）による排泄時間の遅延が完全に抑制された。また、末梢のオピオイド受容体拮抗薬のナロキソンメチオダイト、μ受容体拮抗薬のβ-FNA でも同じく完全に抑えられていた。このことから、モルヒネの便秘作用には末梢のオピオイドμ受容体が関与していることが示唆された。

【結論】本研究の結果から、オピオイド作用薬の便秘作用は消化管の直腸、遠位結腸部位における内容物排出時間の遅延が大きく関与していることが推察された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-166	氏　名	佐藤　崇大
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	ラット胃粘膜初代培養細胞を用いたタイトジャンクションバリアの構築 −粘膜防御機構　Epithlial バリアの役割 -		

【目的】胃は自ら分泌する酸に常に曝されている臓器である。そのため、自己消化から免れるうえで段階的な粘膜防御機構を備えている。その粘膜防御機構は Pre-epithelial バリア、Epithelial バリア、そして Post-epithelial バリアの 3 つに分類され、その中でも Epithelial バリアに分類されるタイトジャンクションバリアは、細胞間を塞ぐ重要な粘膜防御機構であり、細胞間に胃酸などの傷害惹起物質が漏れることを防ぐ機能を有する。これまで下部消化管粘膜細胞株を用いたバリア解析はなされてきた。しかし、胃粘膜細胞株ではタイトジャンクションが形成されず、胃粘膜防御機構におけるタイトジャンクションバリアの研究はほとんど進展がないままであった。そこで本研究では、ラット単離胃粘膜細胞を用いタイトジャンクションバリアを有する初代培養系を確立し、傷害惹起物質であるワサビの辛味成分アリルイソチオシアネート適用によるバリア破壊作用の機序解明を試みた。

【方法】摘出胃標本はペントバルビタール麻酔下雄性 SD ラットから胃を摘出し、胃粘膜管腔面が表側になるように反転し作成した。そして、胃標本の内側にプロテアーゼを注入し、37℃（95%O_2＋5%CO_2 存在下）で 2 時間振とうして胃粘膜細胞を回収した。単離胃粘膜細胞は、10%FBS 含有のメディウムを用い Transwell および 60 mm dish に 4 日間初代培養を行った。なお培養期間中、細胞接着およびモノレイヤーの形成は顕微鏡下の画像をデジタルカメラで記録した。胃粘膜初代培養細胞モノレイヤーにおけるタイトジャンクションバリア測定は、チョップスティック型電極による Milli-Cell ERS システムにて得られる電気抵抗値（TER）で評価した。なお、TER が 1000 Ω.cm^2 未満のものはタイトジャンクションバリアを形成していないとみなしアリルイソチオシアネート適用実験に用いなかった。

【結果・考察】胃粘膜細胞の初代培養は、培養期間中にコンタミネーションを引き起こすなど困難を極めたが、実験台のアルコール洗浄や実験時のマスクの着用による飛沫防止や細胞に物理的障害をあたえないことにより改善された。単離胃粘膜細胞の接着に関しても成長因子を使用しない培養条件下では定着が上昇しないため上皮細胞成長因子や肝細胞増殖因子の使用した結果、細胞定着が改善した。定着が改善したことで電気抵抗値（TER）も増大し、150 Ω.cm^2 前後であった TER も目標であった 1000 Ω.cm^2 には届かなかったが最大で 935 Ω.cm^2 まで改善した。

【結論】本研究で単離胃粘膜細胞からタイトジャンクションバリアを容易に構築することは困難であることが示唆された。しかし、単離胃粘膜細胞による初代培養系を確立することで個体動物でのタイトジャンクションバリア構築を確認することができればアリルイソチオシアネートのタイトジャンクションバリア機能低下について Epithelial バリア段階で検討することができる。今後アリルイソチオシアネートによるタイトジャンクションバリア機能低下について TRPA1 チャネルの関与やイソチオシアネート基など化学構造に起因するか否か、本研究室や他の研究で明らかにされているタイトジャンクションを構成タンパク質の一つであるオクルディンの直接脱リン酸化を促すことについて検討する必要がある。

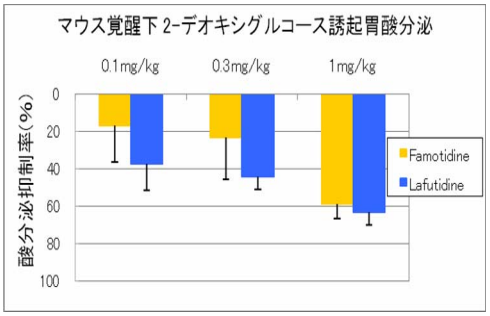
卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-172	氏　名	田口　絵理
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	覚醒下マウスにおけるヒスタミン H_2 受容体拮抗薬ラフチジンの胃酸分泌抑制作用：ファモチジンとの比較		

【目的】消化性潰瘍治療薬 H_2 ブロッカーであるラフチジンは、夜間だけでなく日中の酸分泌も抑制することが臨床的に知られている。また、ラフチジンは H_2 受容体拮抗作用以外にバニロイド受容体 TRPV1 発現神経の活性化作用があることも示唆されている。そこで、ラフチジンの日中酸分泌抑制機構の解明を目的に、中枢性酸分泌刺激薬である 2-デオキシグルコースを用いて、ラフチジンの酸分泌抑制効果についてファモチジンと比較検討を行った。さらに、TRPV1 発現神経を介した酸分泌抑制作用の解明を目的に、カプサイシンによる酸分泌の抑制効果の検討も行った。

【方法】酸分泌は雄性 ddY 系マウス（25～39g）を一晩絶食後、幽門結紮した標本を作成した。覚醒下において 2-デオキシグルコース（600 mg/kg，i.p）により誘起させた。その後胃を摘出し、1 時間あたりの酸分泌量を測定した。ラフチジンおよびファモチジン（0.1～30 mg/kg，s.c）は幽門結紮 30 分前に皮下投与した。TRPV1 受容体遮断薬 N-（4-t-Butylphenyl）-4-（3-chloropyridin-2-yl）tetrahydoropyrazine－1（2H）-carboxamide（BCTC：10 mg/kg，i.p）は幽門結紮 90 分前に、カプサイシン（0.3～100 mg/kg，p.o）は幽門結紮 30 分前に投与した。なお外科的手術後、マウスの吸入麻酔を止め覚醒させた。酸抑制率（%）は[（1－コントロール群の酸排出量平均値/各用量の酸排出量値）×100]の平均値で比較した。

【結果・考察】覚醒下マウスにおいて、基礎胃酸分泌量はおよそ 33.57 μEq/hr に達した。ラフチジンおよびファモチジンは同程度かつ用量依存的に酸分泌を抑制した。2-デオキシグルコースによって酸分泌は有意に増大し、そのときの値はおよそ 67.24 μEq/hr に達し、その増大はラフチジンおよびファモチジン各用量（0.1～30 mg/kg　s.c）前処置によって用量依存的に抑制された。ラフチジンとファモチジンのそれぞれの抑制率を比較すると、最大用量では変化が見られなかったにもかかわらず、ラフチジン（0.1 mg/kg，s.c）のときではおよそ 37.2%であったが、ファモチジンではおよそわずか 17.0%であった。カプサイシン経口投与による酸分泌の抑制作用は、基礎胃酸分泌においてカプサイシン（30 mg/kg，p.o）以上で観察され、この効果は TRPV1 受容体遮断薬 BCTC の前処置によって消失した。



【結論】覚醒下マウスにおいて、中枢性胃酸分泌に対するラフチジンによる酸分泌抑制作用は 0.1 mg/kg（s.c）という用量から認められ、ファモチジンよりも低用量から抑制効果が現れることが判明した。したがって、この実験系はラフチジンの日中における酸分泌抑制効果を反映にいると考えられる。また、カプサイシンによる酸分泌抑制作用は TRPV1 受容体を介することが示唆された。今後、ラフチジンによる日中酸分泌の抑制が TRPV 1 発現神経の活性化を介しているのか、さらなる解明が待たれる。

業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-189	氏　名	吉久保　匡甫
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	麻酔下ラットにおける大建中湯の胃粘膜血流亢進作用に関する薬理学的解析 －バニロイド受容体 TRPV1 の役割－		

研究概要

【目的】大建中湯は現在臨床で一番多く使われている漢方薬であり、腸管粘膜上皮の TRPA1 に働き、また腸管の知覚神経に作用し血管拡張因子を放出させて微小血管を拡張することが解明されている。基礎研究によって、大建中湯は臨床では術後の癒着性イレウスや過敏性腸症候群に使われている。一方、金匱要略には「嘔不能飲食、腹中寒等に大建中湯主之」と記してあり胃も大建中湯が奏功すると考えられる。本研究では大建中湯が胃で血流亢進作用を示すのか、またその作用点はバニロイド受容体 TRPV1 にあるかについて薬理学的解析を行った。また、漢方薬はその温度により効果が違うのかについて検証した。

【方法】SD 系雄性ラット（体重 150～300 g）を用い、ウレタン（1.25 g/kg，i.p.）麻酔下に胃を ex-vivo チェンバーに装置した。胃粘膜血流はファイバースコープを胃粘膜に静置し、レーザードップラー血流計を用いて測定した。大建中湯（40～320 mg/ml）胃内適用は 10 分間行い、その後、生理食塩水灌流下で胃粘膜血流を 50 分間測定した。大建中湯（80～320 mg/ml）の繰り返し投与は 1 回目の適用 50 分後に行った。TRPV1 拮抗薬 N-(4-t-Butylphenyl)-4- (3-chlorophridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1 (2H)　carboxamide (BCTC; 2.7 mM) は、大建中湯適用 40 分前から胃内に前処置した。非選択的 TRP チャネル遮断薬 ruthenium red (1 mg/kg, i.v.) は、大建中湯適用 10 分前から尾静脈内投与した。温度の違いによる実験は 26℃、40℃、50℃の蒸留水に大建中湯（320 mg/ml）を溶かした溶液を胃内に 10 分間適用し、その後、生理食塩水灌流下で胃粘膜血流を 50 分間測定した。

【結果・考察】大建中湯（40～320 mg/ml）の胃内適用は、胃粘膜血流速度を比較すると用量依存的に亢進作用が観察されたが、大建中湯が 320 mg/ml の用量になると胃粘膜血流亢進作用は大建中湯の 40 mg/ml の用量より下回った。大建中湯（80-320 mg/ml）の繰り返し適用は、その血流増大を脱感作させた。大建中湯（80 mg/ml）適用によるラットおよび TRPV1 拮抗薬 BCTC、非選択的 TRP チャネル遮断薬の ruthenium red 処置は大建中湯による胃粘膜血流の増大を抑制した。したがって、大建中湯の胃粘膜血流亢進作用は、TRPV1 神経を介していることが示唆された。また、26℃、40℃、50℃の 3 種類の蒸留水に溶かした場合、50℃の大建中湯が一番強く胃粘膜血流亢進を示した。

【結論】本研究により大建中湯の胃粘膜血流亢進作用が明らかとなった。また、その作用機序は TRPV1 チャネルを介するものであることが示唆された。大建中湯の大量投与では胃粘膜血流亢進作用が弱まることが分かった。胃粘膜の血流亢進作用は胃粘膜保護、修復に寄与することが分かっているので、胃の疾患にも大建中湯は大変有効ではないかと考えられる。また、漢方薬は語尾に湯とつくものが多く、漢方薬は本来お湯に溶かして服用するものであるので、今回の結果より服用の仕方を考えさせられた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-190	氏　名	中嶋　智治
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	抗がん薬誘起消化管障害モデルの空腸における嘔吐関連因子の変化		

【目的】日本人の主要死因別死亡率の第 1 位は悪性新生物と報告されている。臨床現場での消化器がんに対するレジメンには 5-fluorouracil (5-FU) が多く含まれ、5-FU は大腸がんや胃がんなどの消化器がんの化学療法における最も代表的な抗がん薬の一つである。5-FU は胃から大腸に至る消化管粘膜を障害するが、中でも空腸粘膜における障害が顕著であり、この空腸粘膜障害が嘔吐の原因であることが報告されている。がん化学療法の副作用の中でも悪心・嘔吐は患者が最も嫌う副作用の一つであることが知られている。抗がん薬治療に伴う悪心・嘔吐の発生機序にセロトニン (5-HT) が関与し、特にセロトニン 5-HT_3 受容体を介して延髄の嘔吐中枢を刺激することで悪心・嘔吐が誘発されることが報告されている。また、遅発性の嘔吐に対して substance P (SP) やその受容体である NK-1 受容体が関与すると考えられている。本研究では、抗がん薬治療に伴う嘔吐の更なるメカニズムの解明を目的とし、正常マウスと 5-FU 投与マウスの空腸において 5-HT、tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1)、serotonin transporter (SERT)、セロトニン 5-HT_3 受容体、SP、NK-1 受容体の局在変化を検討した。

【方法】C57/BL6J マウスを用いて control 群は 11：00 と 17：00 に vehicle (20%DMSO、生理食塩水)を腹腔内投与、5-FU 投与群は同時刻に 5-FU (400 mg/kg) を腹腔内投与することでモデルを作成した。投与 4 日後に両群マウスの空腸部位を摘出し組織サンプルを作成した。凍結切片を作成後、免疫組織化学手法を用いて 5-HT、TPH-1、SERT、セロトニン 5-HT_3 受容体、SP、NK-1 受容体を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

【結果】組織所見から control 群に比べ 5-FU 投与群の空腸粘膜が大きく障害されていることが観察された。①5-HT は粘膜に陽性細胞の存在が観察された。定量比較した結果、5-FU 投与による 5-HT 陽性細胞数に変化は見られなかった。②TPH-1 は粘膜に陽性細胞の存在が観察された。5-FU 投与群では TPH-1 陽性細胞数のわずかな増加傾向が認められたが、両群間で有意な差はなかった。③SERT は粘膜に免疫活性が観察された。SERT 免疫活性面積は両群間で明確な変化は観察されなかった。④セロトニン 5-HT_3 受容体は粘膜の神経上に発現が確認されただけでなく、細胞様の構造も観察された。5-FU 投与群においてセロトニン 5-HT_3 受容体発現神経が約 2 倍と顕著に増加した。細胞様の構造に変化は見られなかった。⑤SP は粘膜に SP 陽性細胞、筋層に SP 含有神経の存在が観察された。粘膜の S P 陽性細胞数は両群間で有意な差はなかった。筋層の神経に変化は観察されなかった。⑥NK-1 受容体は主に粘膜に免疫活性が観察された。5-FU 投与群では NK-1 受容体免疫活性面積が約 1.4 倍に増加した。

【結論】5-FU 投与群ではセロトニン 5-HT_3 受容体発現神経の著しい増加が認められたことから、5-FU 投与時における副作用の嘔吐は、空腸粘膜でのセロトニン 5-HT_3 受容体発現神経の増加が関与することが示唆された。今回の研究により 5-FU 投与によってセロトニン 5-HT_3 受容体発現神経が増加することを初めて明らかにした。また、NK-1 受容体が増加傾向にあったことから今後も検討を進めていく予定である。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-201	氏　名	寺舘　未来翔
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	マウス消化管におけるオピオイド受容体の分布と FITC-デキストラン法を用いたオピオイド鎮痛薬の便秘作用評価		

【目的】緩和医療で広く使用されているモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンといったオピオイド鎮痛薬は癌疼痛治療のために用いられている。しかし、便秘の副作用が高頻度に発現することから、患者の QOL を低下させている。オピオイド鎮痛薬による便秘は、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで本研究では、免疫染色法により消化管におけるオピオイド受容体の分布を検討した。また、FITC-デキストラン法を用いて消化管全域におけるオピオイド鎮痛薬の便秘作用の評価を行った。

【方法】実験動物は ddY 系雄性マウスを用いた。免疫組織化学：マウスの下部消化管の凍結切片を作製し､1 次抗体として抗オピオイドμ受容体抗体､抗神経型 NO 合成酵素(nNOS)抗体、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ(CHAT)抗体、抗セロトニン(5-HT)抗体とインキュベートし、FITC もしくは TRITC の 2 次抗体で蛍光染色した。染色した標本は共焦点顕微鏡（OLYMPUS-FV1000）で観察を行った。FITC-デキストラン法：マウスに各オピオイド鎮痛薬を皮下投与後、FITC-デキストランを経口投与し、2 時間後に消化管を摘出した。胃から大腸を 15 の部位に分け各部位の蛍光強度を測定した。

【結果・考察】免疫染色法による検討により、マウスの回腸、横行結腸、遠位結腸、直腸の筋層間神経叢においてオピオイドμ受容体が広く発現していることが明らかとなった。消化管各部位を比較したところ、オピオイドμ受容体は直腸に最も多く発現していた。二重染色を行った結果、筋間神経叢においてオピオイドμ受容体を発現した神経細胞体は CHAT と多く共存することが明らかとなり、興奮性運動神経を介した輪状筋、縦走筋収縮の調節に関与していることが示唆された。また、オピオイドμ受容体を発現した神経細胞体は nNOS とも共存することが観察されたことより､抑制性運動神経からの NO 遊離を抑制することで輪状筋収縮を引き起こしていることが示唆された。さらに介在神経に含有される 5-HT と共存が観察されたことから、セロトニンを介した経路も関与していることが示唆された。

次に FITC-デキストラン法を用いて、モルヒネ、フェンタニル、オキシコドン皮下投与の消化管運動に対する作用を検討した。その結果オピオイド鎮痛薬は用量依存的な消化管運動抑制作用を引き起こした。この消化管運動抑制作用における機序の検討を行った。モルヒネの作用に対してナロキソン、あるいはμ受容体拮抗薬 β-フナルトレキサミンの前処置は完全に抑制した。したがって、モルヒネの便秘にはオピオイドμ受容体が関与することが確認された。末梢のオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンメチオダイト前処置したところ、消化管運動抑制作用は部分的に抑制された。したがって、モルヒネによる便秘には、中枢神経系のオピオイド受容体も一部関与していることが推察された。

【結論】オピオイド鎮痛薬の作用点であるオピオイドμ受容体は、消化管では直腸の筋層間神経叢に最も分布しており、興奮性・抑制性運動神経や 5-HT 作動性神経の神経伝達を抑制し、便秘が引き起こされることが推察された。そしてモルヒネによる便秘には末梢のオピオイドμ受容体が大きく関与しているが、中枢神経系も一部関与していることが推察された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-216	氏　名	鈴木　梨香子
所属研究室	薬理学研究室		
研究テーマ	過敏性腸症候群モデルにおける大建中湯および小建中湯の痛覚過敏抑制作用		

【目的】 過敏性腸症候群(IBS)は器質的な異常が無いにもかかわらず下部消化管の知覚過敏による腹痛や運動異常、腹部膨満感を起こす疾患で、ストレスや腸の炎症経験が原因の一つであると推測されている。大建中湯は冷えによる腹痛と腹部膨満を改善する漢方薬で、現在 IBS の治療への応用が試みられている。小建中湯は腹直筋の緊張による腹痛を改善する漢方薬である。大建中湯・小建中湯は transient receptor potential vanilloid type1 (TRPV1)やセロトニン 5-$HT_{3,4}$ 受容体への作用を有することが報告されているが、IBS に対する有効性とそのメカニズムは解明されていない。そこで、本研究では発生機序の異なる内臓痛覚過敏モデルを作成し、各モデルにおける大建中湯および小建中湯の作用を検討した。

【方法】ＳＤ系雄性ラットを用いて①幼少期のストレスを想定した母子分離モデル②成長後のストレスを想定した水回避ストレスモデル③過去の腸の炎症を想定した酢酸投与モデルの３種類の内臓痛覚過敏モデルを作成した。内臓痛覚の評価はバロスタット法を用いて 20～80mmHg の各バルーン圧に対する腹直筋の収縮反応を測定することで行った。大建中湯・小建中湯エキスの単回投与の効果は 1000 ㎎/㎏を経口投与し一時間後に内臓痛覚の評価を行った。慢性投与では一日１回 1000 ㎎/㎏を 8 日間経口投与し、8 日目の投与１時間後に評価を行った。また免疫組織化学的手法を用いて病態モデルの S 状結腸標本を染色し TRPV1・セロトニン 5-$HT_{3,4}$ 受容体の分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】母子分離・水回避・酢酸投与モデル動物ではコントロールと比べバルーン圧に対する腹直筋の収縮反応の増加が認められたことから、各処置により内臓痛覚過敏が引き起こされていることが明らかとなった。内臓痛覚過敏モデルラットの S 状結腸粘膜部位における免疫染色では TRPV１とセロトニン 5-$HT_{3,4}$ 受容体が発現した神経線維と細胞様の構造が観察された。正常動物における大建中湯・小建中湯の単回投与ではコントロール群と比べてバルーン圧に対する腹直筋の収縮反応に差は見られなかった。母子分離モデルでは大建中湯・小建中湯の慢性投与群は共にコントロール群と比べて内臓痛覚過敏が抑制された。特に小建中湯の痛覚過敏抑制効果が大きくコントロールレベルまで抑制した。一方、酢酸投与モデルではコントロール群と比べて大建中湯では内臓痛覚過敏が抑制されたが小建中湯では作用が見られなかった。水回避ストレスモデルでの痛覚過敏抑制効果については現在検討中である。

【結論】正常動物において大建中湯・小建中湯の急性投与では内臓痛覚に影響を及ぼさなかった。幼少期のストレスによる内臓痛覚過敏には大建中湯・小建中湯の慢性投与、特に小建中湯が有効であり、腸の炎症経験による内臓痛覚過敏には大建中湯の慢性投与が有効であると考えられる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-015	氏　名	金森　穂高
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	アルコール離脱症状に対する HDAC 阻害剤の影響		

【目的】アルコール依存症の明確なメカニズムは今のところ解明されていないが、注目されている標的部位として、$GABA_A$ 受容体などが上げられている(1)。$GABA_A$ 受容体は、アルコールの長期投与によって、そのサブユニットの量が減少すると報告された(1)。また、アルコール離脱による不安症状が、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 阻害剤の投与で改善されると報告された(2)。今回の実験の目的は、アルコール長期投与マウスの $GABA_A$ 受容体α1 サブユニットに対し、HDAC 阻害剤が影響を及ぼすのかを調べるために行った。

【方法】マウス(C57BL/6J 雄 6 週齢)を使い、11 日間生理食塩水、エタノール 2 g/kg をそれぞれ投与し rota rod 試験でアルコールに耐性が出来ていることを確認、血中アルコール濃度の測定を行う。11 日目には vehicle、TSA 2 mg/kg を投与し、生食群とエタノール群に分けその群をさらに vehicle、TSA 投与のグループに分け、明暗箱による不安状態での移動回数、滞在時間の測定を行った。その後解剖し大脳、小脳、海馬の P2 画分からの $GABA_A$ 受容体α1 サブユニットのタンパク量をウェスタンブロッティングで調べた。

【結果・考察】エタノール投与群は rota rod 試験において運動能の抑制が確認された。また、投与 1 日目と 11 日目を比べると運動能抑制の改善が有意に見られた。血中アルコール測定では、その消失速度がエタノール投与群で有意に増加していることが確認できた。明暗箱試験ではエタノール投与群で不安症状の亢進が認められた。そして、移動回数においてエタノール TSA(−)群と比べ、エタノール TSA(+)群で不安症状の改善が有意に見られた。$GABA_A$α1 の検出について、どの部位でもアルコール投与群ではタンパク量の減少が見られた。アルコール投与 TSA(+)群の大脳、小脳では $GABA_A$α1 は同様に減少していたが、海馬においては、$GABA_A$α1 の減少は見られなかった。

【考察】アルコール長期投与により、このモデルマウスに耐性が認められた。血中アルコール測定から、アルコール代謝速度の亢進が耐性の要因の一つと言える。移動回数を指標とすると、離脱時の不安について、TSA 投与による不安の改善は見えた。$GABA_A$α 1 の検出において、大脳、小脳では TSA の影響は見られなかったが、海馬では $GABA_A$α1 の回復が見られたといえる。

【結論】HDAC 阻害剤による不安の改善と $GABA_A$α 1 の関係について、大脳と小脳では影響をみる事は出来なかった。海馬では、HDAC 阻害剤により長期エタノール投与によって減少した $GABA_A$α 1 のタンパク量が回復した。

【参考文献】

(1) Sandeep Kumar et,al The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol:a decade of progress 2009 DOI 10.1007/s00213-009-1562-z

(2) Subhash C.Pandey et,al Brain Chromatin Remodeling :A Nobel Mechanism of Alcoholism 2008 DOI 10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-025	氏　名	城間　やや
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	アルコール依存症に対する認知度調査		

【目的】　アルコールは、現代社会で生活の一部や文化として親しまれている。しかし、適切な飲酒をしなければ、身体的・心理的・社会的に大きな影響を及ぼすことが知られている。アルコール依存症は否認の病とも言われ、診断を受けない問題飲酒者がいること、適切な治療を受けていない患者がいることも問題となっている。さらに、治療を行う上で、アルコール依存症者自身の誤認、周囲からのアルコール依存症に対する差別･偏見･誤解･認識不足があるとの報告がされている(1)(2)。そこで、アルコール依存症患者の周りの人たちの誤解や偏見がアルコール依存症治療への妨げの１つとなっているのではないかと予想し、アルコール依存症に対する認知度を調査する。

【方法】アンケートによる調査を行った。被験者は３２９人で、城西国際大学の学生（薬学部、他学部）や事務員・シニアウェルネス学部など一般の方に配布した。

【結果・考察】

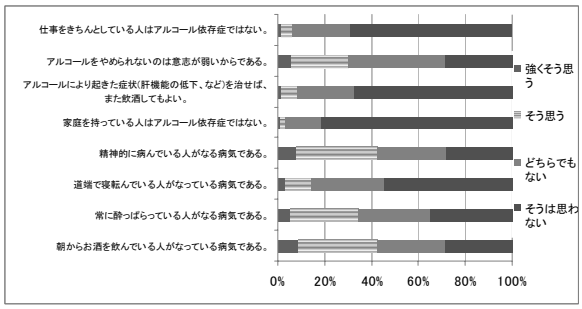


Fig.　偏見や誤解の起こりやすい項目の認知度

被験者を薬学部学生・一般社会人・他学部学生の３つのグループに分け解析したところ、どのグループも１(朝からお酒を飲んでいる人がなっている病気である)，２(常に酔っ払っている人がなる病気である)，４(精神的に病んでいる人がなる病気である)，７(アルコールをやめられないのは意思が弱いからである)と思うかとの質問に対して「強くそう思う」「そう思う」が多かった。「強くそう思う」「そう思う」の割合は３つのグループでほぼ同じような傾向を示した（Fig)。また、「断酒会の存在を知っているか」という質問に関して解析したところ、医療を学んでいる薬学生は認知度が高いと予想していたが意外にそうでなく、一般が最も高い結果となった。そこで、次に年代別に解析をしたところ、年齢が増すにつれて断酒会の存在を知っている割合は増えることがわかった。、アルコール依存症が高い年齢層で多く見られる病気ということからアルコール依存症に接する機会が多かったこと、人生経験の豊富さや年を重ねるにつれて入ってくる情報量が増大することがこの結果にあらわれているのではないかと考える。この他に、年齢、勤務者かどうか、医療分野に携わっているかなどで被験者を分類し認知度を解析したところ、いくつかの項目に関して有意差が得られた。有意差が得られた項目はさまざまであったが、偏見や誤解が少なくともあり、属性によって認知度に差があるということが考えられる。

【結論】　結果から、アルコール依存症に対し少なくとも偏見や誤解があるということがわかったことは、今後アルコール依存症の治療を行うにあたり、偏見や誤解をなくすために正しい知識を普及していくべきであるということが示唆される。

【参考文献】

(1) 岩田裕也他　社会医学研究 (2008) Vol.26 P.65-75

(2) Cohen E. et al. Drug and Alcohol Dependence (2007) vol.86 P.214-221

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-060	氏　名	大村　奈央
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	薬物治療と飲酒に関する意識調査		

【目的】適正な飲酒はヒトに陶酔感を与え、疲労を軽減し、社会的な繋がりを促すなど有用な面はあるものの、アルコールを過剰に摂取すると様々な問題が生じる。また、アルコールと注意が必要な医薬品は多くある[1)]。そこで、一般の方（患者含む）と薬剤師の２グループに対してアンケート調査を行い、一般の方はアルコールと医薬品の併用が有害であることを意識しているのか、またどのくらいの頻度で併用が起こっているのか、薬剤師は患者がアルコールと医薬品を併用することにどのくらい注意し、対応しているかを調べることにした。

【方法】アンケートによる調査を行った。被験者は、一般の方で 381 名、薬剤師で 137 名である。一般は、薬学部・他学部・シニアウェルネス学部・薬局来局者を対象とし、アンケートを行った。薬剤師は、千葉県薬剤師会を通して FAX によるアンケート調査を行った。

【結果・考察】

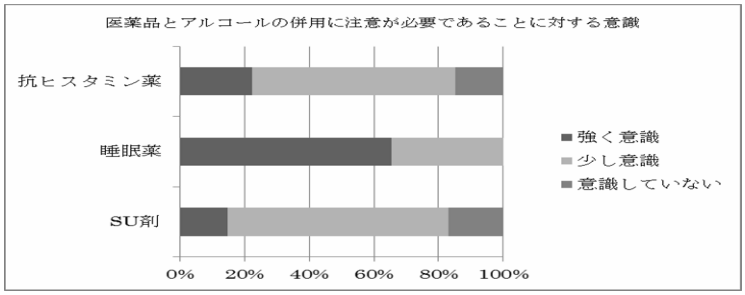


Fig.1　薬剤師向けに医薬品とアルコールの併用に関する意識調査の結果

(1)一般の人向け調査：お酒とお薬の飲み合わせに関して、気になることがある人は 60%と多いが、実際に自分で調べたり、薬剤師に尋ねるなどして行動に移した人は 25%と少なかった。飲酒の頻度が高い人は、低い人より、お酒とお薬の飲み合わせに関して気にすることがある割合は少なく、また概ねお酒とお薬の併用頻度が高い。また、服用中の薬がある人は、ない人より併用頻度が高かった。

(2)薬剤師向け調査 : 医薬品とアルコールの併用に注意が必要だと意識しているかと質問したところ、睡眠薬はアルコールとの併用に関して意識している人や患者の飲酒状況の確認を行っている人が多いが、SU 剤や抗ヒスタミン薬に対しての意識・確認は、睡眠薬に比べて少なかった（Fig.1）。睡眠薬とアルコールの併用は、薬理作用から考えてわかりやすいためだと考えられる。その他、年齢、支部などにより医薬品とアルコールの併用に対する意識に差が見られた。

【結論】

(1)一般の人向け : 飲酒頻度の高い人と薬を継続服用している人は、お酒とお薬の飲み合わせに関して特に注意が必要である。

(2)薬剤師向け : お酒と併用に注意が必要な医薬品は多くあるが、お酒との併用に対しての飲酒状況の確認のされ方・意識のされ方には、医薬品の種類や薬剤師の年数などによって温度差がある。多くの薬剤にアルコールと注意が必要なことを喚起することが大切だと考えられる。

【参考文献】

[1)] アルコールと医薬品の相互作用　関東中央病院耳鼻咽喉科部長　梅田悦生　著

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-099	氏　名	飯村　可南子
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	薬学部生の長期実務実習が睡眠に及ぼす影響		

【目的】現在日本では 4～5 人に 1 人が睡眠に関して何らかの問題を抱えているとされており、夜間の睡眠時間の短い人達はどの年齢層でも見られるが、特に 10～20 歳代で最も著しいことが示唆されている。学生は有職者や主婦に比べ 7 時間 44 分と睡眠時間が長いことが報告されているが、学生の中でも大学生の睡眠時間は時代が進むにつれて短縮されており、近年では 7 時間を切り、5 時間ほどの学生も増えてきている。長期実務実習では、病院や薬局という慣れない環境での影響で疲労や緊張が高まり、睡眠効率の低下や総睡眠時間の減少につながると思われる。そして、睡眠状況の変化が実習中のヒヤリハットや医療過誤にもつながるのではないかと考えた。今回の研究では、睡眠状況の変化や疲労感を主観的、客観的双方の点から調査することにより、実習期間中と普段の学校生活での睡眠状況の違いを調査する。また、実務実習 2 週目と 9 週目とでも睡眠状況の変化があると考え、これらの睡眠状況の違いについても検討を行う。

【方法】薬学部実務実習生 20 人を対象に、アクチグラフを用いた測定を実習期間中の 2 週目（2011 年 1 月 16 日～24 日）と 9 週目（3 月 6 日～3 月 13 日）、および大学生活での 1 週間（4 月 9 日～17 日）の 3 回に分けて行った。また、アクチグラフ装着期間中は毎日の睡眠記録表の記入、各回の測定終了後にアンケートを実施した。

【結果・考察】実習期間のアクチグラフでの測定の結果から、9 週目は 2 週目より就寝時刻の後退、総睡眠時間の短縮、睡眠効率の低下が認められた。就寝時刻が後退した原因として、まだ慣れない実習環境のため、肉体的・精神的疲労感からも就寝時間が 9 週目より早かったのではないかと考えた。総睡眠時間の短縮、睡眠効率低下に関しては、中途覚醒時間の延長と睡眠潜時の延長が寄与したと考えられる。発生する時間帯としては 10～14 時頃に多くみられた。種類としては数量間違いが最も多く、続いて規格・剤形違い、薬剤取り違えが多かった。これらについては、実習先での調剤できる時間帯や取り扱っている処方せん枚数などにも影響があると考えられる。実習先でのミスについて、睡眠状況との何らかの関連があるのではないかと予想している。今後、普段の大学生活と実務実習期間での睡眠状況の相違点を検討する。起床時刻と就寝時刻の後退や総睡眠時間の延長、また、睡眠状況の乱れが普段の生活では実習期間と比べ多く起こるのではないかと考えられる。さらに、アンケートでの主観的な疲労感とアクチグラフでの客観的睡眠測定での関連を深くつきとめていく必要がある。

アクチグラフ測定結果	2 週目	9 週目
In Bed Time	0:29　±0:54	0:39　±0:56
Latency	3.9　±2.2	5.4　±2.7
Efficiency	88.9　±4.4	87.1　±6.1
Total Sleep Time	326.6　±66.1	308.7　±61.6
Wake After Sleep Onset	34.5　±10	38.9　±18.0
Average Awakening Length	2.9　±0.55	3.4　±1.2

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-116	氏　名	小平　夏実
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	イミプラミンの時間薬理 ～最適な投与時刻とそのメカニズムの解析～		

【目的】ヒトは朝に起き夜に眠りにつくという 24 時間周期の生体リズムを持っている。ヒトの生理機能が 1 日を通して一定の状態にあるのではなく周期的に変動していることから、同量の薬物によって得られる効果（副作用）が、その薬物の投与時刻に依存して量的・質的に変化することが予想される。うつ病は、朝方気分が悪化し夕方には少し改善することが多い。また、うつ病患者で睡眠障害が多く、治療法として高照度療法が有効な場合があることからうつの病態は生体リズムと深く関連すると考えられている。抗うつ薬の標的であるモノアミン神経系が生体リズムに関与していることからも、抗うつ薬の治療効果にも日内変動がある可能性が大きい。本研究では、イミプラミンを従来よりも有効に使用することを目的として、抗うつ作用の投与時刻依存性と体内動態に着目したメカニズムの検討を行った。

【方法】WistarHannover 雄性ラット（150～260 g）にイミプラミンを朝（8:00 前後 1 時間）または夜（20:00 前後 1 時間）に腹腔内投与した。単回投与ではイミプラミン 30mg/kg、1 週間の連続投与では 10 または 30mg/kg の用量を使用した。FST（Forced swim test）による行動薬理試験はラットの行動を無動、swimming、climbing に分けて抗うつ効果を評価した。単回投与後の血漿を採取し、ジアゼパムを内部標準物質として 5M NaOH、*n*-hexane、CH_3OH、0.05%リン酸を用いて血漿サンプルを作成し、HPLC-UV を用いてイミプラミンとデシプラミンの血漿中濃度の測定を行った。

【結果】単回投与後の FST では、朝投与において著しい無動時間の減少と climbing の増加が観察された。夜投与においては有意な行動の変化が見られなかった。単回投与 1 時間後の血漿中イミプラミン・デシプラミンの濃度測定では朝・夜で著しい差は見られなかったが、夜投与に比べ朝投与において血漿中薬物濃度が高い傾向が見られた。

【考察】FST において NA 神経系の活性化を起こす薬物では無動時間の減少に加え climbing が増加するため、イミプラミンの抗うつ効果は NA 神経系への寄与が大きいことが考えられる。単回投与後の FST の結果からイミプラミンの治療効果には日内変動があり、朝に抗うつ効果が高いと考えられる。また、薬物代謝酵素の活性には日内変動があることが報告されている。イミプラミンの代謝に深く関与する CYP2D6 の活性も夜に高ければ、薬物代謝活性の低い朝ではより血漿中薬物濃度が高くなり、多くの薬物が受容体に結合するため効果が強く現れると考えられる。単回投与後の血漿中薬物濃度には朝・夜の間に有意な差は検出されなかったが、夜投与に比べ朝投与において血漿中薬物濃度が高い傾向が見られたため、投与時刻依存性を生じたメカニズムとして薬物の体内動態の日内変動が関与している可能性が推察された。今回は、単回投与における薬物動態に着目した検討であったが、イミプラミンの長期投与における脳内神経の変化、受容体やトランスポーターのタンパク発現量の検討を加えることにより、長期投与における抗うつ薬の投与時刻依存性を生じるメカニズムが解明されるものと考えられる。

【結論】正常ラットにおけるイミプラミンの単回投与では、朝と夜について投与時刻依存性が観察された。投与時刻依存性が生じるメカニズムの 1 つとしてイミプラミンの薬物代謝酵素の日内変動が関与していることが示唆された。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-130	氏　名	中村　裕次
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	カモミールティー摂取が睡眠に及ぼす影響		

【目的】現在の日本では、国民のおよそ 5 人に 1 人が睡眠に関する問題を抱えているといわれている。睡眠に影響を及ぼす要因は様々なものが挙げられる。カモミールは何千年にわたりヨーロッパなどで広く親しまれており、睡眠障害の治療に使われている。カモミールの成分同定で、アピゲニンというフラボノイドが含まれていることが分かり、ラットを用いた実験でアピゲニンがベンゾジアゼピンと同様の作用を持つということが分かった。しかし、ヒトに対してカモミール摂取が、睡眠にどのような影響を及ぼすのかあまり実験は行われていない。よって、本研究ではカモミールのベンゾジアゼピン様作用による睡眠と鎮静への影響を調べ、相関を調べた。

【方法】カモミールティーと睡眠に影響を及ぼさない麦茶で、クロスオーバー法を用いて一週間介入実験を行った。就寝一時間前にカモミール４ｇもしくは市販の麦茶のパックを、コップ一杯のお湯で５分間抽出して摂取させた。ウオッシュアウト期間は一日とし、一週間の間、行動量を測定するアクチグラフを装着させた。また四日目と八日目に、ストレスを緊張-不安（T-A)、抑うつ-落ち込み（D)、怒り-敵意（A-H)、活気（V)、疲労（F)、混乱（C）の６つの尺度から測定する気分プロフィール検査（日本版　短縮版 POMS）と、睡眠環境や飲料についてのアンケートを実施した。また、毎日の就寝・起床時間、睡眠に影響を及ぼすアルコール・喫煙・カフェインを摂取した量及び時間、飲料の味が苦手で飲みやすくするために何かを加えた場合、加えたものを記入するように指示した。

【結果・考察】プロトコールを定めるために 20 代男子学生２名で予備研究を行った。対照飲料は用意せず、実験と同じ方法でカモミールティーを 3 日間摂取し、アクチグラフにて睡眠中の行動量を測定した。アクチグラフは、総睡眠時間、入眠潜時、中途覚醒、睡眠効率などを客観的に測定することができる。主観的な睡眠では正確な睡眠状況を測ることが難しいため、本研究ではアンケートによる主観的評価とアクチグラフによる客観的評価を比較することで、睡眠にどのように影響するのかを推測することとした。また、過去１週間と、介入した３日間について気分プロフィール検査を実施した。カモミールティー摂取前と摂取後での気分プロフィール検査の結果は、怒り-敵意（A-H）に変化はなく、混乱（C）がわずかに上昇し、それ以外の項目が低下している傾向が見られた。（Table1）この結果から、気分プロフィール検査は、指定した期間内でのストレスの変化を測ることができることが分かり、飲料を摂取した期間内でのストレス変化を測定したい本研究に適していると言える。

（Table1）気分プロフィール検査の結果

	T-A	D	A-H	V	F	C
非介入時	48	44	41.5	52	54	47
介入時	38.5	40	41.5	42.5	45	48

【結論】本研究での睡眠の評価方法は、睡眠状況を問うアンケートによる主観的評価と、アクチグラフを用いた客観的評価で行う。また、鎮静作用の評価は、指定した期間内のストレスを６つの指標から測定できる気分プロフィール検査で行う。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-131	氏　名	西　春香
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	高齢者における睡眠と活動量との関連		

【目的】高齢者の約 3 人に 1 人が何らかの睡眠の問題を抱えている。睡眠は人生の 1／3 を占め、高齢社会の日本において高齢者がより健康的に日常生活を送るために重要な問題となる。これまでに高齢者における睡眠と活動量との関連を調査した研究はあるが、対象者を施設利用者、運動の介入を行っている者としており、いわゆる活動的な高齢者を対象としている。活動量が減っている高齢者が考慮されておらず、高齢者一般に当てはめて考えることは難しい。そこで今回の研究では、地域高齢者の日常生活における活動量と睡眠との関連を明らかにすることを目的とし、アクチグラフ、睡眠日誌、アンケートにより日常生活における活動量と睡眠状況を主観的・客観的双方の点から検証を行なった。

【方法】60 歳以上の高齢者を対象にアクチグラフによる客観的睡眠状況の調査、睡眠－活動日誌とアンケートによる主観的睡眠状況の調査を行なった。対象者には、事前に装置の使用法およびアンケートの書き方について十分に説明をして、その後 2 週間、測定を実施した。

【結果・考察】対象者は、孫との交流や外食など非日常的なことがない限り、規則的な生活を送っている傾向が見られた。対象者全体の睡眠状況として、主観的睡眠と客観的睡眠との差はほとんど見られなかった。通常、睡眠効率が 85%以上であれば睡眠に問題がないと考えられている。健康な 20 代学生 20 名の睡眠効率を測定したところ約 90%であった。高齢者の睡眠効率は約 83%と 85%以下となっており、若者と比較しても睡眠の質が悪いことが認められた。また、高齢者は中途覚醒回数が多く、中途覚醒時間も長かったため、睡眠を維持できず、睡眠の質の低下につながっていると考えられる。生活形態別に見ると、独居者は非独居者より総睡眠時間が長くなっていた。独居者の総睡眠時間が長い要因として、非独居者に比べて、他者と生活リズムを合わせる必要がなく自由な生活ができ、時間に余裕があるためだと考えられる。独居者の睡眠効率は、非独居者と比べて良い傾向が見られた。通常、総睡眠時間が長くなれば睡眠効率が悪くなる傾向があるが、独居者で総睡眠時間が長いにもかかわらず非独居者よりも睡眠効率が良い傾向が見られた要因として、生活習慣の違いが関与していることが考えられる。対象者全体において、活動量が多いと睡眠効率が悪いという関連性が見られた。また、独居・非独居者別に見てもこの関係は変わらなかった。活動量の増加により睡眠の質が低下するのは、高齢者は代謝などの身体機能が低下しているため、睡眠による疲労の回復が若者よりも遅いことなどが考えられる。今回の検討から、高齢者におけて活動量が多くなればなるほど睡眠の質が低下し、活動量と睡眠の質との関連性が示唆された。今回の検討では、対象者数が少なく、データ数が少なかったため、対象者数をもっと増やして検討していく必要がある。

【結論】今回の対象高齢者全体として、睡眠の質が悪く、睡眠に何らかの問題があることが示唆された。さらに、活動量が増加すると睡眠の質が低下し、活動量と睡眠の質との関連が疑われた。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-168	氏　名	鈴木　文子
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	コルチコステロン投与によるモデルマウス作成とリズム障害の解析		

【目的】うつ症状は朝に重く夕方に向けて軽快化するという日内変動をする。また、うつ病患者で睡眠障害が多く、高照度療法が有効な場合があるなど、生体リズムとの関係を示す事例が多く知られている。このことより、うつと生体リズムに深い関係があると考えられる。今回の検討ではうつ病によるリズム障害を明らかにすることを目的にして、コルチコステロン投与によるモデルマウスの行動変化、特にうつ病と生体リズムに関する検討を行った。

【方法】コルチコステロンを飲み水に混合し６週間自由摂取させることによって、うつ病モデルマウスを作成した。その際マウスの活動量、リズム測定を測定するため赤外線行動解析装置を用いて測定を実施した。６週間自由摂取させた後、モデルマウスの行動変化（うつ病の病態生理）を解明するために強制水泳試験などを用いて計測した。また別の実験として、抗うつ薬であるイミプラミンの治療効果に着目しコルチコステロンを４週間自由摂取させた後、薬物を２週間朝・夜に腹腔内投与した。

【結果・考察】コルチコステロン投与マウスに、体重増加、不安症状、自発運動量の低下、夜間活動量の低下、活動ピーク時刻の後退が見られた。摂取をやめてもすぐにはリズム障害の回復は見られなかった。これらは、長期投与したため体内に不可逆的な変化をきたしていると考える。臨床においてもうつ状態になると不安・焦燥、精神活動の低下、不眠症、脳内変化などが見られるので、今回のモデルマウスは臨床症状と同様の結果が得られたと考えられる。臨床と異なる点として体重増加については、活動量の低下から消費エネルギーが減ってのことだと考える。

イミプラミンにおけるリズム障害に対しての治療効果としては、特に効果は見られなかった。しかしイミプラミン(40mg/kg)を夜投与することによって、活動ピーク時刻のさらなる後退が見られた。これは薬物が体内時計に作用し、リズム障害が起きていると考えられる。

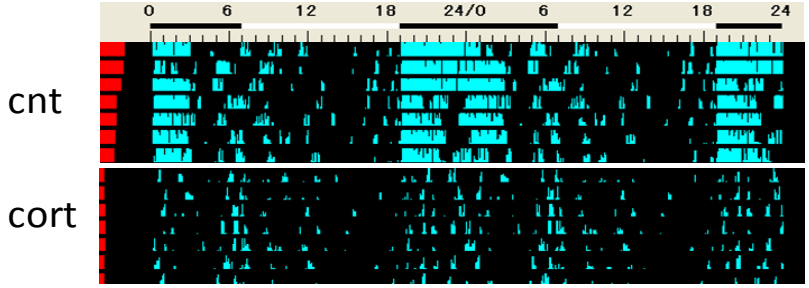


Fig.
コルチコステロン摂取(cort)によって正常活動期における活動力の低下、リズム性の減弱が見られた。

【結論】長期的にコルチコステロン投与を行うことにリズム性の減弱、ピーク時刻の後退というリズム障害が発現することが示唆される。さらにコルチコステロン投与マウスに抗うつ薬であるイミプラミンを長期的に投与することによってピーク時刻の更なる増悪というリズム障害が起きることが示唆される。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-170	氏　名	砂川　夏穂
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	ヘム代謝異常マウスにおけるジアゼパム感受性の差異をもたらすメカニズムの解明		

【目的】ポルフィリン症とは、ヘム生合成経路に関わる酵素の機能が障害されることにより生じる難治性の稀少疾患である。当研究室で行った研究からグリセオフルビン(GF)誘発ポルフィリン症マウスでは、GF 摂取 8 日目にジアゼパム(DZP)の感受性が変化し、抗痙攣作用が増強し催眠作用が減弱した。ヘムの減少あるいはδ-アミノレブリン酸(ALA)の蓄積が GF 誘発ポルフィリン症マウスの DZP 感受性の変化に関わっていると考えられるが、どちらが原因なのか明らかでない。本研究では、急性(神経型)ポルフィリン症の痙攣・不眠症状に注目し、DZP 感受性の変化をもたらす要因についてヘム代謝異常との関連を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】雄性マウス(ICR, 5 週齢, 30-35 g)を用いて、ヘム低下をもたらす HC+CP-55940(CP)群と ALA 上昇をもたらす HC+ALA 群を作成し、実験開始 8 日目に行動薬理試験（抗痙攣試験, 正向反射消失（LORR）試験）を行った。抗痙攣試験では、Vehicle (Veh)または DZP(5 ㎎/㎏)を前投与（p.o.）したポルフリィン症モデルマウスに、ストリキニーネ(Str)(2 ㎎/㎏)を投与(s.c.)し、痙攣潜時を測定した。LORR 試験では、Vehs または DZP(2 ㎎/㎏)を前投与(p.o.)したポルフィリン症モデルマウスにエタノール(EtOH)(4 g/㎏)を投与(i.p.)し、LORR を測定した。

【結果・考察】抗痙攣作用を調べた結果、CP 投与群では、対照群に比べ痙攣潜時に差はほとんど見られなかった。また ALA 投与群でも、痙攣誘発効果にほとんど変化は見られなかった。これらのことから、CP 投与によりヘムが減少した場合でも、DZP の抗痙攣作用に影響を及ぼさないことが分かった。また ALA は、Str に対する DZP の抗痙攣作用には影響を及ぼさないことが分かり、Str 単独投与による痙攣誘発効果や Str に対する DZP の抗痙攣作用に、ALA の蓄積は関与していないと考えられる。正向反射消失試験では、DZP を前投与したときの LORR が CP 投与群で短縮した。その結果、DZP 前投与による EtOH 誘発正向反射消失時間延長作用の減弱にヘムの減少が関与している可能性があると考えられる。また、Veh 前投与においても LORR の短縮が見られたことから、CP の連投が EtOH 感受性を減弱させる効果をもつものと考えられる。ALA 投与では、DZP 前投与した場合 ALA200 群は対照群と比べ LORR が短縮した。また、EtOH 単独による正向反射消失の効果を見た場合、ALA50 群で LORR の有意な延長が見られた。これらのことから、ALA 濃度の違いにより、EtOH の催眠作用及び DZP による催眠延長作用に対して異なる作用を示す可能性があると考えられる。

【結論】GF 摂取マウスで見られた DZP の抗痙攣作用の増強においては、ALA の蓄積と Heme の減少は DZP 感受性に関与していないと考えられる。また、GF 摂取マウスで見られた DZP の EtOH 誘発催眠増強作用の減弱効果においては、高濃度の ALA と Heme の減少が関与している可能性があると考えられる。そして CP の連投や ALA 投与は、EtOH 感受性にも影響を及ぼし、ヘム代謝異常が痙攣や睡眠に対して関与していることが示唆され、今後更なる検討を進める必要性がある。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-173	氏　名	田口　徹
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	アルコール依存症モデルマウスの作成		

【目的】

近年、アルコール依存症患者が増加する一方で、未だにそのメカニズムが解明されていない。しかし、そのメカニズムの有力な受容体として $GABA_A$ 受容体などが注目されている。本実験では、アルコールのメカニズムを検証するためのモデルマウスを作る。

【方法】

マウスを２群に分け、一方にエタノールを 2ｇ/kgを、もう一方に同容量の生理食塩水を i.p 投与した。また、それを１１日間続け、その途上、耐性の指標として運動調整能と体温低下を測定し、離脱の指標として不安状態を明暗箱試験で評価した。①運動調製能(ローターロッド試験:1.6.11 日目の投与後に行った)②体温低下(1.6.11 日目の投与後に行った)に関して解析した。Ethanol は 2ｇ/k ｇ投与量となるように行った。③不安行動(明暗箱試験:11 日目の投与後 8h 後に行った)

【結果・考察】

①ローターロッド試験では、投与前両群に差はなく、投与後には Ethanol 群のみ運動機能低下を起こした。しかし、投与を重ねるとその差が減少していった。②体温低下においては、全測定回数３回（投与１・6・11 回目）とも Ethanol 群のみ体温低下を示した。しかし、投与回数の増加と共に体温低下が抑制された。③明暗箱試験では、投与前では、両群差がみられなかった。しかし、投与後では、Ethanol 群のみ移動回数が減少し、暗い部屋の滞在時間が Saline 群に比べて増加した。

【考察】

①ローターロッド試験では、Ethanol 投与をすると運動機能の抑制が見られた。これは、Ethanol による神経抑制作用であると考える。しかし、投与を重ねると運動機能抑制作用が弱まっている。これは、Ethanol に対する感受性が低下して、Ethanol を投与しても運動機能の抑制が見られなくなったからである。一般に、これを「耐性」という。また、感受性の低下に関与しているのが、Ethanol の作用点の一つである $GABA_A$ 受容体であると推測した。②体温低下では、Ethanol による体温低下作用により、投与後に体温の変化が見られた。しかし、投与を重ねることにより、徐々にその作用も弱まっていった。これは、先ほどの試験の結果からも言えるが、Ethanol に対する感受性が徐々に弱まっているからだと考えられる。③明暗箱試験においては、Ethanol で明るい部屋への滞在時間・移動回数が減少した。このことから、Ethanol 投与により不安症状を引き起こすことを示した。

【結論】

本実験により、アルコール依存症としてみられる「耐性」「離脱症状」を示すモデルの作成に成功した。

【参考文献】Alcohol-induced tolerance and physical dependence in mice with ethanol insensitive α 1 GABAA receptors　Alcohol Clin Exp Res. 2009February:33(2)289-299.doi:1111/j.1530-0277.2008.00832.x.

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-175	氏　名	土井　正人
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	小・中学校教師の睡眠と精神状態の関連性		

【目的】　現在、わが国では成人の 5 人に 1 人が何らかの睡眠に関する問題を訴えていると考えられている。日本人の平均睡眠時間は年々減少しており、さまざまな社会環境の変化が、国民の睡眠時間の短縮をもたらしていると推測される。睡眠障害は、種々の精神疾患や身体疾患の発症リスクとなることが示唆されており、近年では、不眠とうつ病の因果関係が注目されている。大部分のうつ病患者で不眠症状を訴えるなど不眠はうつ病の前駆症状として重要であり、うつ病と不眠症の病態は相互に深い関連を有する可能性が高いと考えられる。さらに、日本では近年精神疾患の患者数が急激に増加している。そのなかでも、学校教師の精神疾患による休職者の数や睡眠時間の短さも指摘されており、睡眠時間の減少が、精神疾患で休職者以外にも精神的に不安定な状態であることが多いということが推測される。現在、学校教師の精神状況と睡眠についての研究はほとんどない。精神疾患と睡眠については関連性が認められており、短時間睡眠と言われている学校教師では、睡眠の質が低いことだけでなく精神状態などに影響を与えることが推測される。そのため、本研究では学校教師の睡眠状態の実態調査とそれが精神状況に与える影響の調査を行った。

【方法】　山武市内の教育委員会の会合に参加した山武市内に勤務する小学校教師、中学校教師に対してアンケート用紙を配布し、睡眠状態や精神状況の調査を行った。アンケート用紙は被験者の睡眠の特性を調査するためにピッツバーグ睡眠質問票（PSQI）と軽度のうつ症状を調査するためにうつ病自己診断チェックシート（SRQ-D）を用いた。

【結果・考察】　平均睡眠時間が 5 時間 54 分であり、日本人全体の平均睡眠時間より 1 時間以上短いことが分かり、男性の方が女性と比べて平均睡眠時間が短く、PSQI 得点も高値であった。入眠潜時や平均起床時刻では性差が認められなかったため、平均就寝時刻の後退が関与していると考察できる。年齢別の平均睡眠時間では、20 代から 50 代にかけて減少傾向となり、日本人全体の傾向と同様の傾向が見られる。年齢別・就業年数別の PSQI 得点や SRQ-D 得点では、年齢・就業年数が増すごとに点数が増加しており、睡眠状態や精神状況が悪化していることが示唆される。SRQ-D の得点別の PSQI 得点の推移では、SRQ-D 得点が増加するにつれて、PSQI 得点が増加している事が分かり、相関性が認められる。横断研究であるため、SRQ-D 得点と PSQI 得点の因果関係は不明だが、睡眠時間の減少や睡眠潜時の延長（入眠困難）が精神状況に影響を与えている可能性や早朝時の爽快感の減少や日中覚醒困難の増加により、抑うつ症状が誘発されるリスクが高まる可能性が考えられる。

【結論】　本研究で、学校教師の平均睡眠時間が短い結果となった。睡眠状態と精神状況との因果関係は不明であるが、睡眠時間の減少や睡眠潜時の延長が精神状況に悪影響を及ぼしているではないかと私は考察した。また、PSQI 得点が高値であると、精神状況が悪化しており、睡眠状態と精神状況が影響を及ぼしている可能性がある考えられる。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-207	氏　名	齊藤　佳子
所属研究室	衛生化学研究室		
研究テーマ	ヘム代謝異常マウスにおける薬物感受性の差異をもたらすメカニズムの解明		

【目的】ヘム生合成に関わる酵素群が先天的あるいは後天的に障害されることによりポルフィリン症が生じる。臨床症状から皮膚型と急性（神経）型に大別され、重篤な発作は死を招くこともあるが、一過性のヘム投与を除いて現在のところ有効な治療法はない。新たな治療法を開発するためにはポルフィリン症の症状をもたらすメカニズムを解明することが重要である。当研究室では、ヘム減少と前躯体である ALA（δ-aminolevulinic acid）の蓄積が生じている griseofulvin（GF）誘発ポルフィリン症マウスで GF 摂取 8 日目に易痙攣性や睡眠時間短縮の症状が現れることを見出した。そこで、ヘム代謝異常モデルマウスを用いて行動薬理試験を実施し、薬物感受性を比較することにより、GF 誘発ポルフィリン症マウスで確認された易痙攣性、睡眠時間短縮が、ヘム代謝異常のうちどのような要因に起因するのかを検討する。

【方法】ICR、5 週齢の雄性マウス（30-35 g）で標準食を摂取させた群(HC 群)と GF 含有食を摂取させた群(GF 群)を作成した。また HC 群に ALA を 0 、50、200 mg/kg 投与した HC+ALA 群、およびヘム低下モデルマウス作成のため CP-55940（CP） 0 、1 mg/kg を投与し HC+CP 群を作成した。GF 群には CP を 0 、1 mg/kg 投与した GF+ CP 群も作成した。各群に Bicuculline を 3 mg/kg で s.c.投与し痙攣誘発試験を行い、Pentobarbital を 20 mg/kg 、60 mg/kg で i.p.投与し、正向反射消失試験を行った。

【結果】痙攣誘発試験、正向反射消失試験において HC+Veh と HC+ALA50 には統計的な差が見られなかったが、HC+ALA200 では痙攣潜時、睡眠時間の延長が見られた。CP 投与は、HC 群と GF 群共に Veh と CP の間に有意差は見られず、CP 投与は Bicuculline、Pentobarbital の感受性に影響を及ぼさなかった。

【考察】今回の検討から ALA の蓄積は GF マウスで観察された易痙攣性、睡眠時間の短縮には関与しておらず逆に高用量の ALA は易痙攣性を抑制することが明らかになった。また、CP 投与は HC 摂取マウス、GF 摂取マウス共に易痙攣性、睡眠時間に影響を与えないことも示された。しかし、GF 摂取マウス群は HC 摂取マウス群と比較して、ヘム投与で可逆性を示す痙攣潜時および睡眠時間の短縮が見られており、ヘムの関与が疑われる。GF は CP とは異なるヘム低下やその他メカニズムを有し易痙攣性、睡眠時間短縮を生じさせていると考えられる。

【結論】痙攣誘発試験、正向反射消失試験の結果から ALA の蓄積が GF マウスで見られた易痙攣性や睡眠時間の短縮に影響を与えているわけではないことが明らかになった。GF 摂取マウスで観察された痙攣潜時の短縮、正向反射消失時間の短縮をもたらしたメカニズムには ALA の蓄積は関与せずヘムの低下あるいはその他の要因が関係していることが考えられ、今後更なる検討が必要である。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	pc2006-022	氏　名	小原　直弥
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	喫煙者の２型糖尿病に対するリスク調査論文のデータ再現		

【目的】　現代社会において、生活習慣病は深刻な問題となっている。生活習慣病がリスクファクターとして挙げられる糖尿病は増加傾向にあり、日本糖尿病学会によれば糖尿病予備軍を含めると１８７０万人にものぼると発表している。実際に長期実務実習中に受け付けた処方箋は、高血圧、２型糖尿病など生活習慣病と深く関わる疾患が多かった。患者さんと対話した際に、生活習慣病あるいは疾患のリスクファクターを挙げることはできるが、改善は難航している患者さんが多いことがわかった。そこで、リスクファクターの重要性を患者さんに伝えることでより理解を得られるのではないかと考えた。今回の演習では、患者背景として身近であること、さらに長期実務実習中の 2010 年 10 月よりタバコの増税が行われたことから禁煙をするために禁煙外来に通う喫煙者が増加した背景から、『喫煙と２型糖尿病』を題材としている論文を選択し、データ再現を手法とした論文評価を行い、患者さんにどのように指導すべきであるか検討した。

【方法】Smoking, Smoking Cessation, and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus　A Cohort Study　*Ann Intern Med.* 2010;152:10-17　から得られたデータを Excel を用いて統計解析を行った。論文中に記載されている P 値が解析データと一致していること、作者が言及していることが論文中データと一致していることを確認することを評価とした。

【結果】　患者特徴のデータは、群人数、標準偏差、人数の割合が表記されていることから期待値が求められ、２×４のχ二乗検定により P 値を算出することができた。このデータと論文データを比較すると小数点第３位で一致した。大きく異なったデータは家族糖尿病歴であり、0.48 であるところ、0.13 となった。異なった理由としては、今回用いた再現の手法が Excel によるものであったこと、データが抽象的なものであったことが挙げられた。その他 Hazard ratio、Hazard ratio(95% CI)、incident rate で表現したデータがあるが、再現を行うためのデータが欠損していた。

【考察】　この論文では、ピアソンのχ二乗検定、F 検定などの多彩な統計解析が行なわれていた。今回の演習では、最も容易にできることを目的としているために Excel のみでの解析を行なった。データの不足もあるが、解析するには Excel のみでは困難であると感じられた。今後の課題として、JMP、SPSS を使用し、よりデータの再現を鮮明化していく。

論文の結果としては、研究者の予想通り、禁煙者より禁煙者で糖尿病リスクが高いことが明らかとなった。禁煙を行なった被験者の中では、禁煙開始から３年間が最もリスクが高く、その後低下し、禁煙開始から 10 年後以降にはリスクは非喫煙者並となった。このリスク増加には、この時期の体重増加が一部には影響していた。

患者さんに行なうアドバイスとしては、禁煙から 3 年間は定期的に受診をすることを勧めるとともに、禁煙することで健康上に利点があることを明確に説明した服薬指導を行う。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-050	氏　名	青沼　正之
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	「An Oral Spleen Tyrosine Kinase(Syk) Inhibitor for Rheumatoido Arthritis」のデータ再現		

【目的】

第１期に薬局実習へ行き、様々な薬剤を見て、様々な患者さんと接してきたが、その中でも多かったのが関節リウマチであり、薬剤を服用しても中々治らずに長期間服用し続けている人もいた。そういった現実を見てきたため、既存の薬剤だけではなく、より良い関節リウマチ治療薬がないかと興味が高まっておりこれまでの薬剤とは違った薬理効果を示す新薬に関する論文を探していたところこの論文を見つけたため、自分でデータを再現してみる事で論文の内容が信頼できるものかどうかの検討を行った。

【方法】

論文名「**An Oral Spleen Tyrosine Kinase(Syk) Inhibitor for Rheumatoid Arthritis**」

N Engl J Med 2010; 363:1303-1312　September 30, 2010

この論文は新薬 R788 を 150mg1 日１回投与と 100mg1 日２回投与の２種類に分けてプラセボと比較して効果があったかについて調べる試験を行っている。効果を調べる方法として主要評価項目に ACR20 改善率（米国リウマチ学会が提唱する治療の有効性を評価する指標）が設定されており、論文中では数値に有意差があるためプラセボに比べて優れているものとしている。そこで、このデータが本当に正しいのかを論文で挙げられている数値に対してｔ検定及びχ２乗検定を用いてＰ値及びχ２乗値の確率を算出し、その値が論文内のデータと一致するかを調べる事で差の有無やデータの信頼性について確認した。

【結果】

各群の ACR のデータについて計算してみた所、ｔ検定を用いた項目は 150mg 投与群と 100mg 投与群の両方共論文で示されている数値と一致した。χ２乗検定を用いた項目では、R788 の 150mg 投与群ではプラセボと差がなく、100mg 投与群では差があった。

【考察】

ｔ検定を用いた項目では 150mg 投与群においてＰ値が論文内に示されていないデータが３つあるがこれは恐らく一般的な有意水準とされる 0.05 よりも大きい値が出たのだと考えられ、自分が計算したＰ値もいずれも 0.05 よりも大きくなったため一致したとみなした。

χ２乗検定を用いた項目については、プラセボ群と R788 群全体を比較すると R788 群の方が優れていたと言えるが、R788 群の中で 150mg 投与群と 100mg 投与群を比べた場合では 100mg 投与群の方が優れていたのだと考えた。この事は論文中でも同様の記載があったため、自分の計算結果は論文内のデータと一致していると言える。

これらの事から、R788 の効果についてのこの論文は信頼できる情報であると分かり、次の臨床試験や今後の関節リウマチの新たな治療方法として期待が持てそうである。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-081	氏　名	鶴岡　美幸
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	経口ビスホスホネート製剤と食道・胃・結腸直腸がんのリスク関係のデータ再現		

【背景】薬局実務実習では主に整形外科と耳鼻科の処方せんが来る薬局で実習をおこなったのだが、患者は高齢の方が多く、整形外科の処方せんを持って来る人の中にはビスホスホネート製剤を服用している患者も多くいた。骨粗鬆症の治療薬の中でもビスホスホネート製剤は用法に特に注意が必要な薬剤である。しかし服用しているのは高齢の患者さんが多く、このように用法が他の薬と大きく異なっているような薬をちゃんと飲めているのだろうか。60 歳代の女性の 3 人に 1 人、70 歳以上だと 2 人に 1 人が骨粗鬆症といわれている中で、ビスホスホネート製剤のコンプライアンス不良や副作用による食道がんの危険性はあるのかどうか、という疑問を持ち他の消化器がんと区別してある論文の信頼性を確かめることでその疑問を検討した。

【方法】“Oral bisphosphonates and risk of cancer of oesophagus, stomach, and colorectum: case-control analysis within a UK primary care cohort” BMJ 2010; 341:c4444 doi: 10.1136/bmj.c4444 (Published 2 September 2010) の内容の信頼性を確かめる。この論文ではビスホスホネート製剤が食道がん、胃がんと結腸直腸がん(食道がんと対比させるために)についてのリスクを増加させるかを調べてある。 Table 1 のデータから Excel を利用して期待値を出し、P 値を計算して検討した。Table 2 のデータから相対危険度の再現をし、論文と一致しているか検討した。

【結果】論文中には P 値が出ていないので、実際に P 値があっているかは確認できないが、ケース群とコントロール群で差があるかどうかは確認できた。本文中に食道がん・胃がんは喫煙者に多く、結腸直腸がんでは喫煙者・非喫煙者に差は見られないとあったが、計算した値だと結腸直腸がんにも差が見られると出た。Table 2 については、それぞれの疾患に対してケース群とコントロール群の相対危険度を使って差があるかないかを示しているのだが、再現してみたところ、論文中の相対危険度とは完全には一致しなかった。食道がんに対するビスホスホネート製剤のリスクはあるという結果になった。

【考察】結果が完全に一致しなかった理由として考えられることは、Table 1 についてはこの論文で使用していたのと同じ統計ソフトを使用しなかったことや何らかのバイアスがかかっていたことが考えられた。Table 2 については、リスク比が補正相対危険度として調べられていたこと、Excel で手計算をして再現しようとしたことなどがあげられる。また、Table 2 の中には Missing という欠損したデータがいくつか書かれていて、このデータの考え方によっても値が変わってしまったかもしれない。しかし、Table 2 で書かれている食道がん、胃がん、結腸直腸がんのビスホスホネート製剤に対する相対危険度はそれぞれ論文と類似した結果になったので、今回の再現では論文と同じようにビスホスホネート製剤が食道がんのリスクを増加させる結果となったといえる。そして、相対危険度を増加させる結果になったので、私が薬剤師として服薬指導をすることになったときには、飲み方に特に注意してもらうよう気をつけていきたい。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-090	氏　名	松田　恭平
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	高タンパク食・低 GI 食ダイエットに関する介入研究の統計学的分析		

【目的】

ドラッグストアでの薬局実務実習の経験から，中高年層においてダイエットへの関心の高いことがわかった．彼らにアドバイスを求められた事が切っ掛けとなり，高タンパク食ダイエットや低グリセミック指数ダイエットへの関心をもった．この論文では，低カロリーダイエットによる減量後の体重維持が，タンパク質及びグリセミック指数(GI)の摂取量が異なる食事介入により，どう影響を受けるか調査した大規模研究を題材に，統計的な再現とその内容の分析を行った．

【調査内容】

題材論文は Larsen TM, Dalskov S, Baak M, *et al.* "Diets with High or Low Protein Content and Glycemic Index for Weight-Loss Maintenance" *New England Journal of Medcine* 2010; 363: 2102-13、欧州8カ国で肥満成人を対象とし，8週間の低カロリーダイエットのによる減量フェイズの後，26週間の維持フェイズにおいて各食事介入群にランダムに割り振り，体重の増減や腹囲の変化の等を比較した研究である．今回はこの研究のうち以下の事について代表して統計再現と内容の考察を行った．

1．コントロール群と 4 つの食事介入群間のすべての組み合わせについて，維持フェイズ中の体重変化に差があるか t 検定を行った（題材論文の Table 2 参照）

2．各食事介入群間における，維持フェイズ中の5%以上の減量達成の分析におけるオッズ比算出（題材論文の Table 3 参照）

【結果】

1．すべての組み合わせのうち，有意差が見られたのは低タンパク高 GI 食群・高タンパク低 GI 食群間だけであった．(P=0.012)

2．表中のオッズから単純に計算したオッズ比はどれも記載されているものと若干異なった値を示したが，全体的な傾向は一致していた．

【考察】

1．低タンパク高 GI 食群・高タンパク低 GI 食群間のみ有意差を示した事や，各食事介入群とコントロール群に有意差が見られなかった事は本文中の記述と一致した．しかし高タンパク食群・低タンパク食群間および低 GI 食群・高 GI 食群間での比較ではどちらも有意に差がみられた(それぞれ P=0.003，P=0.003)と本文にある．グループの分類方法の違いで結果が異なったのは，群間のタンパク摂取量および摂取 GI の差が当初の想定より小さくなったことや，研究終盤にアドヒアランスの低下が見られたことが影響しているのではないかと考える．

2．表中に記載されたオッズはバイアスに関して未調整であり，オッズ比はバイアスを調節し算出した値である．従ってそのオッズから直接計算したオッズ比は記載されたものと異なる値となったと考えられる．しかしオッズ比の全体的な傾向においては記載値と計算値は一致しており，高タンパク食群及び低 GI 食群で維持フェイズ中の5%以上の減量達成が有意に多い事は明らかである．

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-102	氏　名	井原　奈津美
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	抗うつ剤レボキセチンのシステマティックレビューとメタアナリシスのデータ再現		

【目的】薬局実務実習でうつ病の患者に投薬する機会が多くあり、患者の経過観察を行う中で抗うつ剤の有効性について興味を持った。現在臨床で使用されている抗うつ剤の有効性は６０～７０％にすぎず、重症度によっても効果が異なるとされている。また、患者から抗うつ剤の有効性について問われることがあり、確立されたエビデンスによって得た情報を提供する必要があると感じた。そこで、メタアナリシスによって抗うつ剤レボキセチンの有効性・有害性を評価した研究について、データ再現を行いその研究の信頼性を明らかにし、１つの抗うつ剤の例としてレボキセチンの有効性を判断する。また、出版バイアスが医学的介入にどのような影響を与えるのかを検討する。

【方法】Reboxetine for acute treatment of major depression: systematic review and meta-analysis of published and unpublished placebo and selective serotonin reuptake inhibitor controlled trials. BMJ.2010;341:c4737 により得られたデータを再現し、寛解率、反応率、有害事象発生率、有害事象発生による服薬中止率の、オッズ比(OR)、９５％信頼区間(CIs)を、さらには出版バイアスを評価するために%変化(ORpublished / ORtotal data -1)を算出し、データ比較を行った。再現は MIX バージョン１．７で行った。

【結果】全てのデータが一致した。

研究データ

	Odds ratio (95% CI)	P-value	Publication bias (%)
Reboxetine v placebo			
Remission	1.17 (0.91 to 1.51)	0.216	115
Response	1.24 (0.98 to 1.56)	0.071	99
Patients with adverse events	2.14 (1.59 to 2.88)	<0.001	25
Withdrawal owing to adverse events	2.21 (1.45 to 3.37)	<0.001	-57
Reboxetine v SSRIs			
Remission	0.80 (0.67 to 0.96)	0.015	23
Response	0.80 (0.67 to 0.95)	0.01	19
Patients with adverse events	1.06 (0.82 to 1.36)	0.667	1
Withdrawal owing to adverse events	—	—	-12

再現データ

	オッズ比（95%信頼区間）	P値	出版バイアス(%)
レボキセチン対プラセボ			
寛解率	1.17 (0.91 - 1.51)	0.216	115
反応率	1.24 (0.98 - 1.56)	0.071	99
有害事象発生率	2.14 (1.59 - 2.88)	<0.001	25
有害事象発生による服薬中止率	2.21 (1.45 - 3.37)	<0.001	-57
レボキセチン対SSRIs			
寛解率	0.80 (0.67 to 0.96)	0.015	23
反応率	0.80 (0.67 to 0.95)	0.01	19
有害事象発生率	1.06 (0.82 to 1.36)	0.667	1
有害事象発生による服薬中止率	—	—	-12

【考察】再現データの一致という点において、研究の信頼性は非常に高く、論文で述べられていた“レボキセチンは包括的に見て無効であり有害性が目立つ抗うつ剤である”という結論を肯定する結果となった。また、出版バイアスが真の結果以上の評価を与えており、臨床で使用されている他の抗うつ剤の公表データにもこのような出版バイアスが存在するならば、有効性はさらに低くなり臨床的に意義がないと推測される。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-133	氏　名	西澤　慎也
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	学校ベースの介入治療による糖尿病リスクの減少に関する統計再現		

研究概要

【目的】近年 2 型糖尿病の患者が増加傾向にあり、問題視されている。長期実務実習においても、2 型糖尿病治療薬の処方をよく目にするとともに、インスリン自己注射の指導や糖尿病の方への服薬指導を行う機会があった。指導するにあたり、食事療法や運動療法も学んだことから、食事療法、運動療法、健康意識の向上を促すといった治療薬以外の面にどの程度のリスク因子を低下させる働きがあるのかと思い、今回の論文を選んだ。

【方法】　論文タイトル「A School-Based Intervention for Diabetes Risk Reduction」

N Engl J Med 2010; 363:1769-1770 October 28, 2010

選んだ論文では、米国 7 地域にある 42 の学校、総生徒数 4603 名を対象とし、学校単位での多面的介プログラムを実施する学校(介入群 21 校)と評価のみを行う学校（対照群 21 校）のいずれかに学校単位で無作為に割り付けた。両群ともに、6 年生の開始時と 8 年生の終了時に生徒の体格指数（BMI）、胴囲、空腹時血糖値・インスリン値を測定し、その値を評価の指標としている。

論文に記載されているデータから、Excel を用いて示されている数値が算出できるか、対象となっている 4603 名の生徒の背景に介入群、観察群間での違いがないかの検討を試みる。

【結果】介入群、対象群で参加した学生の背景が、参加者全体(N=4603)と BMI<85th percentile にあてはまる人たちのデータにおいて、人種の分布に差がある。BMI≧85th percentile の人たちでは参加者の人種の分布に差がないという計算結果となった。

また、BMI、ウェスト周囲、空腹時インスリン値、空腹時血糖値といった評価項目に設定した値のオッズ比が、95%信頼区間内の値にはなるものの、ずれた値が算出された。

【考察】参加した学生の人種の分布に差があると出たものの、BMI≧85th percentile の人たちでは、両群の人種の分布に差がないという結果であり、この介入研究では、2 型糖尿病のリスク因子をいかに減らすことができるかを見ているため、BMI≧85th percentile の人たちで差がなければ、影響はほとんどないものと考えられる。

再現した数値が異なっていたが、今回データの数値を再現するにあたり、元データを入手することができなかった。再現に使用したデータは調整された数値であり、計算に使用しているデータそのものに差があること。また、今回計算するにあたり Excel を用いたが、論文内では一般線形混合モデルを用い、個体差、場所差の影響を考慮しながら別の統計ソフトを用いて計算されていると考えられ、用いている方法の違いから、傾向は類似しているが、算出された数値そのものの値は異なったと考えられる。使用した論文では、過体重、肥満の生徒の割合に関して、試験終了時で介入群、対象群共に減少が見られ、減少率に有意な差が認められなかったが、腹囲の90パーセンタイル以上の割合や研究開始時に BMI85th percentile 以上だった者での肥満率など一部の因子は対象群と比べて介入群で減少していた。なぜ対象群で介入群と同様の肥満、過体重の改善が見られたかが、今後分析される必要があるが、食事・運動・病識面で介入することによって糖尿病高リスク群のリスク因子を低下させる可能性はある。

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006-204	氏　名	牧野　莉佳
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	低用量アスピリンの無作為化試験を調査した論文のデータ		

【目的】長期実務実習先では 2 規格のアスピリンが採用されており、低用量アスピリンを扱うことが圧倒的に多かった。低用量アスピリンは脳梗塞の予防に効果があると聞いた事があった為、それが真実かどうか確かめたいと思いアスピリンの効果について調査した。男性に対する低用量アスピリン投与の心筋梗塞一次予防の有効性は報告されている*。そこで今回は、女性に対する一次予防効果を研究した論文を選択し、論文記載のデータから統計結果を再現し、論文の信頼性を確かめることを目的として、女性における低用量アスピリンの効果の検討を行った。

【方法】A Randomized Trial of Low-Dose Aspirin in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Women. *N Engl J Med* 2005;352:1293-304 により得られたデータの再現を行った。再現はすべて Excel を用いて行い、2 群間の基本特性はカイ二乗検定と t 検定を使い、罹患率は相対危険度（RR）や 95%信頼区間（CI）、p 値を用いてデータの比較を行った。

【結果】再現したデータはほぼ一致したが、一部解析結果と解釈が矛盾している点を発見した。

table1 基本特性《Body-mass index》

	アスピリン 26.1±5.1	プラセボ 26.0±5.0	合計 26.0±5.1	2 群間の差	t検定量	P 値	95%信頼区間	
平均	26.1	26.0	26.0	0.1	1.97	0.048	0.00086	0.19914
例数	19934	19942	39876					
標準偏差	5.1	5.0	5.1					

【考察】論文のデータをもとに結果を再現したところ、基本特性の BMI は、論文中は差がないと記載があったが解析結果は有意水準 0.05 で有意だった。そこで、なぜ統計学的に有意差のある結果を差がないと判断したのかを考えた。t 検定量はデータ数が多くなると大きくなり、帰無仮説を棄却する可能性が高くなる。そこで、BMI の 2 群間の差は 0.1 と小さく臨床的に意味の無い差と考えられる。そのため、統計学的には有意差が生じたが、扱ったサンプル数が多かったことと 2 群間の差の値を考慮して、2 群間に差はないと解釈したと考えた。実際に統計解析をして、解析結果と論文中の結果がほぼ一致した為、データ処理の信頼性を確認することが出来た。論文の結果としては、アスピリンは脳卒中のリスクを低下させたが、心筋梗塞のリスク、心血管系の原因による死亡のリスクに対しては効果が無く、主要エンドポイントに関して有意な結果は見られなかった。

*参考文献「Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989; 321(3): 129-35」

卒業論文（2011 年度）

学籍番号	PC2006‐213	氏　名	佐久間 泉
所属研究室	臨床統計学研究室		
研究テーマ	変形性関節症患者に対するグルコサミン、コンドロイチン、プラセボの無作為化対症試験におけるネットワークメタアナリシスのデータ再現		

研究概要

【目的】現在、国による政策や高齢化等により健康への関心が高まり、市場には健康食品が数多く流通している。各メディアによる CM や広告が目に入らない日はない。薬局長期実務実習により OTC 販売の意義を確認している中で、高齢者の健康食品摂取頻度の高さを実感し、中でもコンドロイチンやグルコサミンの消費が多いことを感じた。コンドロイチンやグルコサミンの関節炎に対する研究は多数行われているが未だその効果が明確にされていないのが現状である。患者に関節痛に対する健康食品摂取についての相談をされた際に EBM を実践するために薬剤師はどのような行動を取ればよいか、論文の信頼性という観点から検討した。

【方法】股関節または膝の変形性関節症患者に対するグルコサミン、コンドロイチン、又はその併用とプラセボの効果をネットワークメタアナリシスで評価した以下の論文について統計処理をエクセルや統計ソフトを用い再現し、ネットワークメタアナリシスについて調査した。効果の指標としてビジュアルアナログスケール(VAS)の減少を用いた。

BMJ 2010; 341:c4675 doi: 10.1136/bmj.c4675 (Published 16 September 2010)

「Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis」

【結果】この論文では統計処理を再現することが出来ない。一般にメタアナリシスは複数の臨床試験の結果を合わせて解析し、より信頼性の高い結果を得る検定法であるがこの論文で用いられているネットワークメタアナリシスでは個々の試験の詳細なデータを入手する必要があるため再現には至らなかった。ネットワークメタアナリシスは間接的推定メタアナリシスや多層比較メタアナリシスとも呼ばれ、各試験における治療群の距離をモデル化したネットワーク地図を作成し、個々の試験に発表されているオッズ比とその信頼区間を利用して、論文中で直接比較していない治療群間の差を検定する方法である。仮に試験１で A 薬と B 薬の有効性を比較し、A 薬が B 薬より優れていると判明したとする。試験２では B 薬と C 薬を比較し、B 薬と C 薬の効果は同等であると判明したとする。試験１、２より B 薬と C 薬が同等であるなら、B 薬より優れている A 薬は当然 C 薬よりも優れていると判断できる統計的な潜在能力を持つ。利点として、直接比較でなくとも間接比較で有意な検定を行うことが出来るため、新たに試験を行うことなく既存の関連する試験を用いて症例数が多いメタアナリシスを行うことが出来ることが挙げられる。

【考察】今回の検討より、ネットワークメタアナリシスを用いたこの論文においてグルコサミンやコンドロイチンの経口摂取は関節痛抑制の効果がないことが明らかになった。ネットワーネットワークメタアナリシスの普及により更に信頼性の高い情報提供を行う事が可能になると考えられる。